

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II**

FACOLTÀ DI AGRARIA – PORTICI

Ph.D. in

AGROBIOLOGIA E AGROCHIMICA

XXII° CICLO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL SUOLO, DELLA PIANTA,
DELL'AMBIENTE E DELLE PRODUZIONI ANIMALI

**MOBILITÀ, SPECIAZIONE E FITODISPONIBILITÀ DI
ARSENICO NEL SISTEMA SUOLO-ACQUA -PIANTA**

COORDINATORE:
PROF. M. LORITO

TUTORS:
PROF. A. VIOLANTE
DOTT. M. PIGNA

CANDIDATO:
DOTT. R. M. DE SANTIS

ANNO ACCADEMICO 2006 – 2009

INDICE

1.INTRODUZIONE	1
1.1.1.L'arsenico nella tavola periodica.....	2
1.1.2.L'arsenico ed il suo chimismo.....	2
1.2.Mobilità dell'arsenico nella crosta terrestre.....	3
1.3.L'origine naturale ed antropica dell'arsenico.....	6
1.4.La tossicità dell'arsenico per l'uomo e per gli animali.....	9
1.5.Interazione dell'arsenico con i componenti del suolo.....	15
1.5.1.Minerali a carica variabile.....	16
1.5.1.1.Ossidi di ferro.....	17
1.5.1.2.Ossidi di alluminio.....	19
1.5.2.Chimica di superficie e reattività dei minerali a carica variabile.....	21
1.5.3.Competizione arseniato-fosfato nei suoli.....	23
1.5.4.Adsorbimento anionico.....	24
1.5.5.Influenza di leganti organici ed inorganici sull'adsorbimento anionico.....	25
1.5.6.Modelli matematici per la descrizione delle reazioni di adsorbimento.....	27
1.6.Speciazione dell'arsenico.....	29
1.6.1.Studi sulla speciazione dell'arsenico nel suolo.....	29
1.6.2.Studi sulla speciazione dell'arsenico nella pianta.....	31
2.SCOPO.....	34
3.MATERIALI E METODI.....	38
3.1.Preparazione degli ossidi.....	39
3.1.1.Preparazione della ferridrite.....	39

3.1.2.Preparazione dell'ossido di alluminio.....	39
3.2.Analisi chimiche sugli ossidi.....	39
3.2.1.Area superficiale.....	39
3.3.Analisi mineralogiche.....	40
3.3.1.Diffrattometria ai Raggi X.....	40
3.3.2.Analisi all'infrarosso IR.....	41
3.3.3. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM).....	41
3.4.Isoterme di adsorbimento.....	42
3.4.1.Adsorbimento competitivo di ioni arseniato e/o arsenito con anioni inorganici ed organici.....	43
3.5.Sperimentazione in vaso.....	43
3.5.1.Inquadramento geomorfologico dell'area campionata.....	43
3.5.2.Modalità di campionamento del suolo inquinata.....	44
3.5.3.Analisi chimico-fisiche del suolo campionato.....	45
3.5.3.1.Analisi fisiche.....	45
3.5.3.1.1.Determinazione della granulometria.....	45
3.5.3.1.2.Determinazione della conduttività elettrica.....	45
3.5.3.2.Analisi chimiche.....	46
3.5.3.2.1.Determinazione del calcare totale.....	46
3.5.3.2.2.Determinazione del carbonio organico e della sostanza organico.....	46
3.5.3.2.3.Determinazione della capacità di scambio cationico (C.S.C.).....	48
3.5.3.2.4.Determinazione delle basi di scambio.....	48
3.5.3.2.5.Determinazione del fosforo totale.....	49
3.5.3.2.6.Determinazione del fosforo assimilabile.....	49
3.5.3.2.7.Determinazione dell'arsenico totale.....	50

3.5.4.Prova sperimentale in vaso su <i>Chicorum indivia</i>	50
3.5.4.1.Micorrize.....	52
3.5.4.2.Campionamento delle piante.....	52
3.5.4.3.Determinazione della concentrazione di arsenico totale e fosforo totale.....	53
3.5.5.Prova sperimentale su <i>Zea Mays</i> cresciuta in rhizobox.....	54
3.5.5.1.I rhizobox.....	55
3.5.5.2.Le micorrize.....	57
3.5.5.3.Campionamento del suolo rizosferico.....	57
3.5.5.4.Campionamento delle piante.....	58
3.5.5.5.Determinazione della concentrazione di arsenico totale e fosforo totale.....	58
3.5.5.6.Determinazione dell'arsenico disponibile nel suolo rizosferico mediante l'uso di tecnologia Diffusive Gradientb in Thin films (DGT).....	59
3.5.5.7.Speciazione dell' arsenico.....	61
3.5.5.7.1.Estrazione delle specie dell'arsenico dal suolo.....	61
3.5.5.7.2.Estrazione delle specie dell'arsenico dai vegetali....	62
3.5.5.7.3.Determinazione delle specie dell'arsenico.....	62
4.RISULTATI, DISCUSSIONI E CONCLUSIONI.....	64
4.1. Reattività di anioni As(III) e As(V) su ossidi di Fe e di Al.....	65
4.1.1.Ossido di ferro.....	65
4.1.2.Ossido di alluminio.....	68
4.1.3.Area superficiale.....	70
4.1.4.Adsorbimento di As(III) e As(V).....	70
4.1.5.Adsorbimento competitivo di ioni As(III) e leganti inorganici e organici sulla ferridrite e sull'ossido di alluminio amorfo.....	76

4.1.6.	<i>Adsorbimento competitivo di ioni As(V) e leganti inorganici e organici sulla ferridrite e sull'ossido di alluminio amorfo.....</i>	80
4.1.7.	<i>Conclusioni.....</i>	83
4.2.	<i>Prova sperimentale su Cichorium indivia.....</i>	85
4.2.1.	<i>Caratteristiche chimico fisiche del suolo campionato.....</i>	86
4.2.2.	<i>Produzione di biomassa.....</i>	87
4.2.3.	<i>Concentrazione e contenuto di As negli organi vegetali.....</i>	89
4.2.4.	<i>Contenuto e concentrazione di P negli organi vegetali.....</i>	93
4.2.5.	<i>Rapporto del contenuto di P e di As negli organi vegetali....</i>	96
4.2.6.	<i>Conclusioni.....</i>	98
4.3.	<i>Prova sperimentale su Zea mays.....</i>	100
4.3.1	<i>Caratteristiche chimico-fisiche del suolo campionato.....</i>	101
4.3.2.	<i>Speciazione e frazione biodisponibile dell'arsenico nel suolo.....</i>	102
4.3.3.	<i>Produzione di biomassa.....</i>	105
4.3.4.	<i>Contenuto e concentrazione di fosforo negli organi vegetali.....</i>	107
4.3.5.	<i>Contenuto, concentrazione e speciazione dell'arsenico negli organi vegetali di arsenico.....</i>	110
4.3.6.	<i>Conclusioni.....</i>	116
BIBLIOGRAFIA.....		118
<i>Ringraziamenti.....</i>		126

1.INTRODUZIONE

1.1.1 L'arsenico nella tavola periodica

L'arsenico appartiene al V gruppo della tavola periodica degli elementi. Il numero atomico è 33 e la densità di 5,72 g/cm³; sublima a 613 °C e presenta un punto di fusione di 814 °C. La sua forma cristallina è di colore grigio metallico lucente. Queste proprietà sono alla base del tradizionale test di Marsh per l'arsenico (Reilly, 1991). All'aria l'arsenico metallico si ossida lentamente ricoprendosi di uno strato di colore bruno, ma a temperatura abbastanza elevata può venire incendiato e brucia spandendo fumi bianchi dal caratteristico odore agliaceo. Gli stati di ossidazione sono: -3, 0, +3 e +5.

1.1.2 L'arsenico ed il suo chimismo

I più comuni composti inorganici dell'arsenico sono l'ossido di arsenico trivalente (As₂O₃) detto arsenico bianco e l'ossido di arsenico pentavalente (As₂O₅). In acqua gli ossidi danno gli acidi corrispondenti, acido arsenioso (H₃AsO₃) e acido arsenico (H₃AsO₄). La conversione dall'acido arsenioso a quello arsenico può avvenire facilmente perché lo stato di ossidazione +5 è quello termodinamicamente più stabile. Con gli alogeni l'arsenico forma gli alogenuri, simili agli alogenuri del fosforo e dello zolfo ed assai diversi dagli alogenuri metallici: sono infatti liquidi o solidi a basso punto di fusione, facilmente volatili ed a contatto con l'acqua producono gli idracidi corrispondenti. A caldo l'arsenico si combina con molti metalli formando composti binari. L'elemento forma anche composti organici di grande interesse. A partire dall'arsina si formano RAsH₂, R₂AsH e R₃As. Per riduzione e metilazione successiva dell'acido arsenico si può ottenere l'acido

monometilarsonico $\text{CH}_3\text{AsO}(\text{OH})_2$ (MMAA), l'acido dimetilarsinico $(\text{CH}_3)_2\text{AsO}(\text{OH})$ (DMAA) ed infine la trimetilarsina $(\text{CH}_3)_3\text{As}$ (TMA).

1.2 Mobilità dell'arsenico nella crosta terrestre

L'arsenico è il 20 elemento in ordine di abbondanza nella crosta terrestre (Adriano, 1986). Spesso lo troviamo combinato allo zolfo in minerali quali arsenopirite (AsFeS), realgar, orpimento ed enargite. La concentrazione di As nell'aria varia a seconda che si tratti di aree incontaminate o di zone industrializzate: va da pochi ng/m^3 a qualche decina di $\mu\text{g/m}^3$ (Lucisano, 1989). Nel suolo i livelli di arsenico, in assenza di contaminazioni agricole e industriali, vanno normalmente da un minimo di 1 mg Kg^{-1} ad un massimo di 40 mg Kg^{-1} (Walsh et al., 1997). Nella maggior parte delle rocce il contenuto medio di As varia da 0,5 a $2,5 \text{ mg Kg}^{-1}$ (Buck, 1978), sebbene alte concentrazioni sono state trovate nei sedimenti argillosi. La tabella 1.1 mostra i contenuti di arsenico in vari materiali di origine geochimica.

L'arsenico si può trovare in natura in più di 200 differenti forme minerarie, di cui il 60% come arseniato, il 20 % come solfuro e sali solforici ed il restante 20% comprende arseniti, ossidi, silicati ed arsenico in forma elementare (Onishi, 1969), ma solo alcune di queste forme sono comunemente ritrovate in quantità significative (Tabella 1.2). Livelli superiori possono essere rilevati in seguito ad attività mineraria, contaminazione da attività industriale e dall'uso di fitofarmaci a base di arsenico.

Tab1.1: Concentrazione di arsenico in vari materiali terrestri	
Materiali	Arsenico (mg kg⁻¹)
<i>Rocce ignee</i>	
<i>Acide</i>	
Riolite (effusive)	3.2–5.4
Granito (intrusive)	0.18–15
<i>Neutre</i>	
Latite, andesite, trachite (effusive)	0.5–5.8
Diorite, granodiorite, sienite (intrusive)	0.09–13.4
<i>Basiche</i>	
Basalto (effusive)	0.18–113
Gabbro (intrusive)	0.06–28
<i>Ultrabasiche</i>	
Peridotite, dunite, serpentinite	0.3–15.8
<i>Rocce metamorfiche</i>	
Quarzite	2.2–7.6
Slate/phyllite	0.5–143
Schist/gneiss	0.0–18.5
Rocce sedimentarie	[7–9]
<i>Marine</i>	
Shale/claystone (nearshore)	4.0–25
Shale/claystone (offshore)	3.0–490
Carbonates	0.1–20.1
Phosphorites	0.4–188
Sandstone	0.6–9
<i>Non-marine</i>	
Shales	3.0–12
Claystone	3.0–10
<i>Sedimenti recenti (marini)</i>	
Muds	3.2–60
Argille	4.0–20
Carbonati	<1.0
Stream/river (mineralized area)	5.0–4000
Torba	2.0–300

Tab1.2: principali minerali dell'arsenico presenti in natura

Minerale	Composizione	Fonti
Arsenico nativo	As	Vene idrotermali
Proustite	Ag_3AsS_3	Uno dei più recenti minerali di argento nella sequenza dei giacimenti primari
Rammelsbergite	NiAs_2	Di solito vene dei giacimenti mesotermali
Safflorite	$(\text{Co,Fe})\text{As}_2$	Generalmente vene dei giacimenti mesotermali
Seligmannite	PbCuAsS_3	Presenti in vene idrotermali
Smaltite	CoAs_2	In giacimenti metalliferi associata a minerali di cobalto
Niccolite	NiAs	Generalmente vene dei giacimenti mesotermali
Realgar	AsS	Vene dei giacimenti, spesso associato con orpimento, argille, calcare e depositi da calde primavere
Orpimento	As_2S_3	Vene idrotermali, calde primavere, processo di sublimazione vulcanica
Cobaltite	CoAsS	Giacimenti alte temperature, rocce metamorfiche
Arsenopyrite	FeAsS	Il più abbondante minerale dell' arsenico
Tennantite	$(\text{Cu,Fe})_{12}\text{As}_4\text{S}_{13}$	Vene idrotermali
Enargite	Cu_3AsS_4	Vene idrotermali
Arsenolite	As_2O_3	Minerali secondari formati da ossidazione di arsenopirite, arsenico nativo ed altri minerali dell'arsenico
Claudetite	As_2O_3	Minerali secondari formati da ossidazione di realgar, arsenopirite ed altri minerali dell'arsenico
Scorodite	$\text{FeAsO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Minerali secondari
Annabergite	$(\text{Ni,Co})_3 (\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Minerali secondari
Hoernesite	$\text{Mg}_3 (\text{AsO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Minerali secondari, materiali di scarto
Haematolite	$(\text{Mn,Mg})_4\text{Al}(\text{AsO}_4) (\text{OH})_8$	Minerali secondari
Conichalcite	$\text{CaCu}(\text{AsO}_4)(\text{OH})$	Minerali secondari
Adamite	$\text{Zn}_2(\text{OH})(\text{AsO}_4)$	Minerali secondari
Domeykite	Cu_3As	Giacimenti formati a temperature moderate
Loellingite	FeAs_2	Giacimenti fusi in vene mesotermali
Farmacosiderite	$\text{Fe}_3(\text{AsO}_4)_2(\text{OH})_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Prodotto dall'ossidazione di arsenopirite ed altri minerali dell'arsenico

1.3 L'origine naturale ed antropica dell'arsenico

La volatilità relativamente elevata di molti composti dell'arsenico implica che il suo ciclo geochimico includa un flusso significativo attraverso l'atmosfera. Chilvers e Peterson (1987) stimano che il flusso globale di arsenico di origine naturale proveniente dall'atmosfera è di 45 000 t/anno.

Dopo la volatilizzazione a bassa temperatura, l'altra importante fonte naturale di arsenico nell'atmosfera è l'attività vulcanica (Chilvers and Peterson, 1987) che su scala locale può essere la principale fonte di deposizione di arsenico. Nel suolo le specie dominanti sono l'arseniato e l'arsenito (Deuel and Swoboda, 1972; Walsh and Keeney, 1975).

Le stime dei flussi di arsenico di origine antropogenica attraverso terre, oceani, sedimenti e atmosfera valutano che il flusso totale di arsenico derivato dall'attività antropica sulle terre emerse è di 64-132 t/anno (Smith et al. 1998) e che il maggior contributo sia dovuto ai rifiuti commerciali (~40%), all'estrazione di carbone (~22%), alla deposizione sul suolo delle immissioni atmosferiche dovute all'attività delle acciaierie (~13%) e all'industria mineraria (~16%). Queste fonti differiscono ampiamente per natura e composizione. Tali variazioni hanno implicazioni sulla disponibilità biologica così come sulla mobilità dell'arsenico nel suolo. Vengono in seguito brevemente trattate le più importanti fonti di arsenico di origine antropogenica.

- Industria: Nella lavorazione di ceramica e vetro, nell'elettronica, nella produzione di detersivi e coloranti, cosmetici e fuochi d'artificio (Leonard, 1991) si utilizza arsenico, viene inoltre aggiunto al rame per aumentarne la resistenza alla corrosione (Nriagu, 1994). La principale forma di arsenico prodotta per l'industria è l' As_2O_3 . L'ossido arsenioso viene recuperato dalle scorie della lavorazione dei metalli (Loebenstein, 1993). Dai

pochi dati disponibili, pare che la produzione di As_2O_3 sia rimasta relativamente costante intorno alle 50 t/anno dal 1985 al 1990 (Loebenstein, 1993), nonostante la riduzione dell'uso di composti contenenti arsenico in agricoltura.

- Estrazione mineraria: l'arsenico è inoltre una componente naturale dei minerali grezzi di Pb, Zn, Cu e Au. È quindi possibile che durante l'estrazione di questi minerali o nello smaltimento delle scorie venga rilasciato nel sistema.

- Carbone: generalmente la concentrazione di arsenico nel carbone varia tra 2 e 82 mg/kg, a seconda dell'origine geologica (Adriano et Al., 1980). Si ricorda però anche una concentrazione elevatissima (oltre 1500 mg/kg) nel carbone bruno della vecchia Cecoslovacchia (Bencko and Simon, 1977). La specie dominante è l'arseniato (As V) ma l'arsenito (As III) che è molto più tossico può rappresentare dal 2 fino al 40% dell'arsenico solubile.

- Scarti di conceria: storicamente l'arsenito di Na è sempre stato utilizzato nel trattamento delle pelli animali. La concentrazione dell'As in suoli contaminati per irrigazione con liquidi di scarto o per sotterramento delle scorie va da 1 a 500 mg/kg (Sadler et Al., 1994).

- Selvicoltura: l'arsenico ha eccellenti proprietà nella conservazione del legno ed è spesso utilizzato nell'industria del legname oltre al Cu e Cr. Il suo utilizzo per la conservazione del legname aumenta approssimativamente dell'1-2% ogni anno (Loebenstein, 1993).

- Agricoltura: i composti dell'arsenico sono stati largamente utilizzati in agricoltura per oltre un secolo (Jiang and Singh, 1994) come fitofarmaci e come promotori della crescita per pollame e suini. In seguito all'uso di larghe quantità di composti inorganici dell'arsenico sono aumentati i residui nei suoli e nei sedimenti dei laghi. PbAsO_4 , CaAsO_4 e altri composti dell'As

sono stati introdotti dalla fine del 1800 come fitofarmaci, soprattutto nei frutteti, ma il loro uso è ora in declino essendosi all'incirca dimezzato tra il 1970 e l'inizio degli anni '80 (Alloway, 1992). I composti dell'arsenico, a causa dell'effetto fitotossico sono stati utilizzati come erbicidi e disseccanti, ma data la permanenza a lungo termine delle caratteristiche fitotossiche di questi prodotti, questo tipo di utilizzo sta cadendo in disuso. I fertilizzanti fosfatici possono essere fonte di As nel suolo.

La concentrazione di As dipende dal tipo di roccia da cui il fertilizzante deriva. La forma inorganica pentavalente l'arseniato As(V) è la specie maggiormente presente nei suoli in condizioni aerobiche, mentre viceversa l'arsenito è la specie chimica maggiormente presente in condizioni anaerobiche (Smith et al., 1998). Tuttavia entrambe le forme possono essere contemporaneamente presenti sia in ambienti ossidanti che in quelli riducenti a causa della relativa lentezza delle trasformazioni da una forma all'altra (Sadiq, 1996; Smith et al., 1998). La mobilità dell'arsenico nel suolo dipende dal tipo e dalla quantità di colloidali (Fe, Mn, Al, minerali argillosi e sostanza organica) presenti nel suolo, i quali sono responsabili del suo adsorbimento, dal pH, dal potenziale redox e dalla presenza di altri anioni che competono con l'arsenico per gli stessi siti di adsorbimento (Sadiq, 1996). La mobilità dell'arsenico dal suolo alla pianta è piuttosto ridotta per la maggior parte delle piante. Questo può essere spiegato da diverse ragioni:

- (a) bassa biodisponibilità di As nel suolo,
- (b) limitato assorbimento da parte delle radici ,
- (c) limitata traslocazione di As dalle radici al germoglio
- (d) fitotossicità da arsenico a concentrazioni relativamente basse nei tessuti delle piante .

1.4. La tossicità dell'arsenico per l'uomo e per gli animali

Più di 40 milioni di persone rischiano la propria vita a causa della contaminazione delle acque dal metalloide. La maggior parte di queste persone (circa 30 milioni) vivono nel Bangladesh, nel West Bengala ed in India dove l'acqua contenente elevate concentrazioni di arsenico viene usata per il consumo idrico. Da una stima approfondita è risultato che circa 1000 tonnellate di arsenico all'anno sono state aggiunte al suolo agricolo del Bangladesh attraverso l'irrigazione utilizzando acque provenienti dalle falde acquifere che possono avere concentrazioni di arsenico anche superiori a 200 microgrammi per litro.

L'arsenico inorganico, sia trivalente che pentavalente, viene facilmente assorbito dagli alimenti nel tratto gastro-intestinale in quantità che dipendono dalla forma chimica in cui l'elemento si presenta. L'arsenico assorbito viene prontamente trasportato a tutti gli organi ed i tessuti come complesso, probabilmente tramite α -globuline. Dopo 24 ore le concentrazioni negli organi generalmente iniziano a decrescere per l'eliminazione di arsenico dall'organismo, che avviene principalmente con le urine, mentre nella pelle si assiste ad un incremento dei livelli per numerosi giorni. L'accumulo si può avere nella pelle, nelle unghie, nei capelli ed in piccola quantità nelle ossa e nei muscoli.

I composti di arsenico organico sono generalmente considerati assorbibili in bassa misura dai mammiferi e vengono rapidamente eliminati con le urine. La biometilazione quindi può essere considerata una detossificazione perché i composti metilati dell'arsenico sono meno tossici e più facilmente escreti. Il metabolismo degli organoarsenicali all'interno dell'organismo umano non è ben conosciuto; sembra comunque che vengano

eliminati, in gran parte nelle 24 ore successive l'ingestione, per via fecale ed urinaria senza subire alcuna trasformazione.

Le quantità di arsenico totale nel corpo sono tra 14 e 20 mg (Reilly, 1991). I livelli di As nel sangue e nelle urine sono stati utilizzati per misurare l'esposizione all'elemento tossico, mentre i capelli vengono impiegati specialmente nelle indagini medico-legali. In alcuni casi è stato possibile determinare il massimo cronologico di ingestione dell'elemento; in casi di avvelenamento acuto sono stati trovati livelli di As nei capelli da 5 a 700 mg kg⁻¹.

La presenza nel suolo di arsenico, soprattutto in forma ridotta, determina per l'ambiente conseguenze estremamente gravi; infatti, può essere assorbito dalle piante ed entrare quindi nella catena alimentare, ma soprattutto può essere lisciviato in profondità con il rischio di contaminare acque di falda. Sono tristemente noti dalla letteratura i numerosissimi casi di avvelenamento acuto e/o cronico provocati da acque contaminate da arsenico in numerosi paesi tra cui: Bangladesh, Bengala, Africa (Figura 1.1).

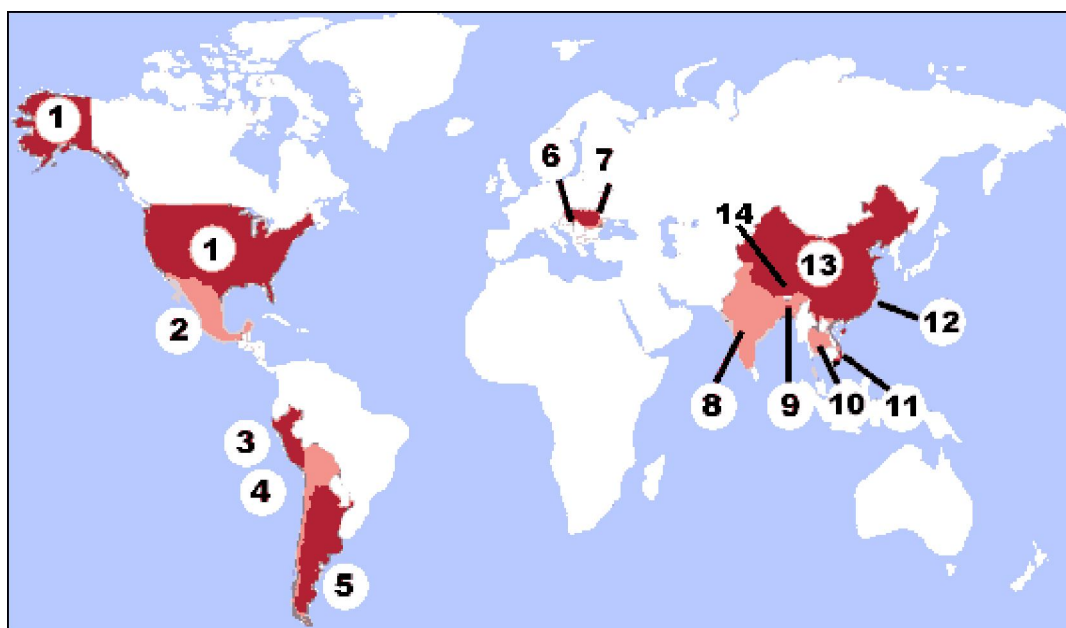


Figura 1.1: Numero di persone a rischio per l'inquinamento da Arsenico 1. US Unknown; 2. Mexico 400,000; 3. Chile 437,000; 4. Bolivia 20,000; 5. Argentina 2,000,000; 6. Hungary 20,000; 7. Romania 36,000; 8. India 1,000,000; 9. Bangladesh 50,000,000; 10. Thailand 1,000; 11. Vietnam Millions; 12. Taiwan 200,000; 13. China 720,000; 14. Nepal Unknown.

È sempre più grave, infatti, la situazione ambientale in Bangladesh. Secondo studi recentemente pubblicati su riviste internazionali, l'arsenico presente in molti dei pozzi rurali starebbe contaminando attraverso l'irrigazione anche le coltivazioni di riso. Descritto dagli esperti come il "peggior avvelenamento di massa della storia". Circa 36 milioni sono stati esposti alla contaminazione, che causa cancro e malattie della pelle (Ahmed e Rahman, 2001; Christen, 1999).

La presenza dell'arsenico nell'ambiente fa sì che l'uomo ne ingerisca regolarmente piccole quantità (circa 15µg al giorno). L'arsenico è comunque un veleno che si accumula nell'organismo; circa l'80% della quantità ingerita si concentra in tessuti quali fegato, intestino, ossa, pelle, peli, capelli ed unghie.

Il principale responsabile dell'avvelenamento acuto è il triossido di arsenico, la cui dose letale è circa 70-180 mg. I composti trivalenti, a livello sistemico, provocano dilatazione dei capillari che, aumentando la permeabilità, produce cambiamenti del circolo e conseguenti alterazioni funzionali. Gli arsenicali trivalenti si combinano con i gruppi -SH di proteine, enzimi, coenzimaA e glutathione ridotto. Gli arseniti inoltre si accumulano nei leucociti e deprimono l'attività degli enzimi contenenti gruppi tiolici, inclusa la DNA-polimerasi.

L'arsenico pentavalente, leggermente meno tossico della forma trivalente, inibisce i sistemi enzimatici come la α -glicerofosfato deidrogenasi e la citocromo-ossidasi.

La tossicità dell'arseniato è stata spiegata in termini di "imitazione molecolare" (Clarkson, 1993). L'arseniato imita il fosfato e viene perciò trasportato attraverso le membrane cellulari su trasportatori fosfato; di conseguenza la sua collocazione nei tessuti segue strettamente quella dei

fosfati. La similarità strutturale dell'ossianione endogeno fosfato con gli ossianioni tossici di arsenico e vanadio si può osservare nella Figura 1.2 ed è alla base del meccanismo di imitazione; le tre molecole sono tutte in forma monovalente e, a pH fisiologico, parzialmente ionizzate.

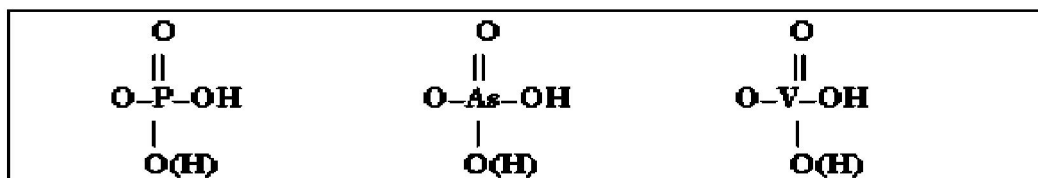


Figura 1.2: Confronto tra le strutture chimiche di fosfato,arseniato e vanadato.

L'arseniato può imitare il fosfato endogeno così bene che può partecipare ad una sequenza di reazioni metaboliche fino al fallimento dell'imitazione ed al sopraggiungere delle conseguenze tossiche. Questa abilità nell'imitazione è stata dimostrata in numerosi tessuti di molte specie animali (Wettewrhahn-Jennette,1981).

Gli ossianioni tossici interagiscono con alcuni noti recettori cellulari, come i recettori glucocorticoidei ed i recettori estrogeni. L'arseniato compete con il fosfato nei co-trasportatori fosfato Na-dipendenti nelle cellule di numerosi tessuti (Clarkson, 1993). Kenney e Kaplan (1988) hanno presentato la prova che la pompa sodio ed il sistema di trasporto degli scambiatori anionici delle cellule dei globuli rossi umani accettano l'arseniato come congenere del fosfato.

L'imitazione del fosfato nelle reazioni enzimatiche, comunque, non chiarisce completamente la tossicità dell'arsenico. L'arseniato può essere ridotto in vivo alla forma trivalente, che è legata ai gruppi -SH dell'acido α -lipoico e inibisce la piruvato deidrogenasi.

L'arsenico pentavalente influenza il metabolismo del selenio impedendogli di raggiungere il sito d'azione oppure aumentandone l'escrezione. Il selenio d'altra parte, se aggiunto alla dieta, può prevenire

l'intossicazione da arsenico nei bovini, nei polli, nei suini, nei cani e nei ratti. Sono stati riscontrati effetti additivi di piombo ed arsenico nell'escrezione di coproporfirine (Lucisano, 1989). Sono state anche dimostrate interazioni tra Cd e As ed è probabile che la spiegazione sia ricercare nella similarità dei meccanismi d'azione dei differenti elementi nelle cellule e nei tessuti, specialmente l'interazione con i gruppi sulfidrilici.

I composti arsenicali che più frequentemente sono descritti come cause di intossicazioni, oltre l'ossido di arsenico trivalente, sono il solfuro ed il tricloruro di arsenico, i coloranti arsenicali, gli insetticidi arsenito di piombo e di calcio, le arsine.

Esiste un'ampia casistica epidemiologica, per cui l'ingestione di arsenico con acqua potabile o lunghi contatti con arsenicali usati come antiparassitari predispongono al carcinoma della pelle o al cancro del polmone. L'arsenico può essere cancerogeno ma i rilievi epidemiologici e le evidenze sperimentali sembrano talvolta in contraddizione (Reilly, 1991). Recentemente è stato suggerito che l'elemento da solo non è capace di provocare cancro e quindi sono necessari ulteriori studi per approfondire le conoscenze su questo ruolo (Momplaisir et al., 1991).

Piccole quantità di arsenico agiscono infatti come stimolatori della crescita e, pertanto, vengono aggiunte all'alimentazione dei maiali e del pollame per favorirne l'ingrassamento. A condizione che l'uso dello stimolatore venga interrotto almeno alcuni giorni prima della macellazione, i livelli di arsenico riscontrati nella carne non superano in genere il limite consentito.

L'intossicazione acuta per ingestione di sali minerali di arsenico è caratterizzata al suo esordio da una sintomatologia gastrointestinale (gastralgia, vomito, colica violenta e diarrea irrefrenabile e sanguinolenta).

La conseguenza è una disidratazione rapida che provoca sete intensa, accompagnata da brividi, cianosi e crampi muscolari. La morte sopravviene se la dose ingerita supera i 3-4 mg per kg di peso; nei casi non immediatamente mortali la sintomatologia è completata da un interessamento epatorenale (ittero, epatomegalia, processi nefritici) e da eruzioni cutanee varie.

L'avvelenamento cronico provoca perdita di appetito, calo del peso, disturbi gastro-intestinali, neuriti periferiche, congiuntivite e alterazioni cutanee, come ipercheratosi e melanosi. Quest'ultima malattia, che porta ad una colorazione scura della cute, è caratteristica della prolungata esposizione all'arsenico e può essere un fattore di predisposizione allo sviluppo del cancro alla pelle. L'assenza di effetti mutageni dell'arsenobetaina è stata accertata con prove sperimentali (Michel, 1987).



Figura 1.3: Ipercheratosi, lesioni cutanee e iperpigmentazione sono sintomi tipici di arsenicosi

1.5 Interazione dell'arsenico con i componenti del suolo

Nel suolo l'arsenico si trova principalmente sotto forma inorganica. Negli ambienti areati, ovvero in condizioni ossidanti, la specie più stabile è l'arseniato (AsV), che forma dei forti legami di coordinazione “inner-sphere complexes” con ossidi di ferro, manganese e alluminio, con alluminosilicati a scarso ordine cristallino (allofani ed imogolite) con la sostanza organica, e in parte con i minerali argillosi. Recenti studi condotti su ossidi di ferro, alluminio e manganese hanno evidenziato che gli ioni arseniato sono adsorbiti con maggiore affinità sugli ossidi di manganese e ferro piuttosto che su quelli di alluminio, mentre gli ioni arsenito sono fortemente fissati sulle superfici di ossidi di ferro (ferridrite in particolare) ma molto più debolmente su ossidi di alluminio (Violante e Pigna, 2002; Violante et al, 2006, 2007a). Negli orizzonti ricchi di ferro, dominanti nei suoli acidi, l'arsenico precipita sotto forma di arseniato di ferro, meno solubile dell'arseniato di Ca, la principale forma dell'arsenico nei suoli alcalini e calcarei. La fissazione dell'arsenico sulla sostanza organica avviene soprattutto in corrispondenza dei siti carichi positivamente dove può avvenire con forti legami di coordinazione “inner-sphere” o deboli “outer-sphere”. Sui fillosilicati sia l'arseniato che l'arsenito possono legarsi particolarmente sui siti di vertice e di spigolo di questi minerali argillosi. Tra i fillosilicati quelli del tipo 1:1, quali la caolinite, l'halloysite, la methalloysite etc., riescono a legare più facilmente le diverse forme dell'arsenico essendo percentualmente più elevati su questi minerali i siti a carica variabile (pH dipendenti) rispetto ai siti a carica permanente (negativi). Gli ossidi di Al, Fe e Mn, allofani, etc., usualmente chiamati minerali a carica variabile, sono colloidali positivi ai normali valori di pH del suolo (pH tra 4.0 e 8.0). Al diminuire del pH aumenta la loro carica positiva superficiale. Risulta scontato, dunque, come gli ioni arseniato ed arsenito, siano fissati fortemente su tali tipi di minerali. I minerali a carica variabile possono essere cristallini, a scarso ordine

cristallino e non cristallini ed hanno un ruolo importantissimo sulla mobilità e biodisponibilità di nutrienti ed inquinanti.

1.5.1 Minerali a carica variabile

I minerali a carica variabile (ossidi di ferro, alluminio, manganese, titanio, silicio, allofani, imogoliti) sono caratterizzati da particolari proprietà di superficie e di reattività nei confronti di anioni e cationi. Tra i minerali a carica variabile particolare importanza rivestono gli ossidi del ferro, dell'alluminio e del manganese. Gli ossidi del Fe ed Al sono ubiquitari nei suoli e sono di grande interesse in pedologia ed in chimica del suolo per la loro capacità di adsorbire in maniera specifica metalli pesanti e metalloidi e per il loro impatto sull'ecosistema (Huang and Violante, 1986; Wefer and Misra, 1987; Hsu, 1989; Cornell and Schwertmann, 1996). Essi possono esistere come minerali cristallini, come precipitati a scarso ordine cristallino o amorfi e sono spesso adsorbiti sulle superfici di minerali argillosi o legati intimamente alle sostanze umiche. Gli ossidi di ferro ed alluminio a scarso ordine cristallino sono senza dubbio i componenti inorganici più reattivi dei suoli a reazione acida o neutra (Sparks, 1995; Sumner, 2000). Il ferro, l'alluminio ed il manganese sono liberati nella soluzione attraverso reazioni di *weathering* chimico e possono precipitare in situ o dopo traslocazione nell'ambiente circostante. Gli acidi fulvici ed umici così come le biomolecole prodotte da microrganismi e piante (essudati radicali) sono coinvolti nell'azione di *weathering* dei minerali primari. I composti organici giocano un ruolo importante nelle reazioni idrolitiche del ferro, alluminio e manganese, nonché sulla loro formazione, trasformazione e proprietà di superficie.

1.5.1.1. Ossidi di ferro

Il ferro è presente in quasi tutti gli ambienti terrestri - atmosfera, idrosfera, litosfera, pedosfera e biosfera – e partecipa alle differenti reazioni chimiche di questi ambienti. Ematite [α -Fe₂O₃], goethite [α -FeOOH] sono gli ossidi di ferro più diffusi, mentre lepidocrocite [γ -FeOOH], maghemite [γ -Fe₂O₃] e gli ossidi di ferro a scarso ordine cristallino (ferridrite Fe₂O₃·nH₂O) sono presenti nei suoli in maniera minore (Fig 1.4).

Le caratteristiche più significative di questi minerali sono: la bassa solubilità, il colore intenso, la parziale sostituzione isomorfa del Fe con altri cationi, in particolare Al³⁺ e l'attività catalitica. Inoltre, sono caratterizzati da un'elevata area superficiale, frequentemente superiore a 100 m²/g, questo fa sì che gli ossidi di ferro siano degli ottimi adsorbenti per un ampio numero di ioni, molecole e gas, quali l'arseniato, il fosfato, il solfato ecc. Gli ossidi di ferro influenzano marcatamente le proprietà del suolo, anche a concentrazioni molto basse (1%).

L'alta reattività degli ossidi di ferro si deve alla presenza di gruppi OH⁻ sulla superficie unita alle piccole dimensioni delle particelle e quindi all'estesa area superficiale. È noto che gli ossidi e idrossidi di ferro sono tra i principali responsabili della variabilità di carica dei suoli tropicali e subtropicali. Alla presenza di ossidi di ferro sono collegati fenomeni di forte fissazione del fosfato (Schwertmann, 1985; Schwertmann and Taylor, 1989), ma anche di acidificazione e diminuzione della disponibilità dei nutritivi in suoli a carica variabile.

È stato ad esempio dimostrato che frazioni argillose di suoli a carica variabile della Cina Meridionale, caratterizzate da elevato contenuto in ossidi di ferro cristallini ed amorfi, possono adsorbire ioni fosfato in quantità tanto più elevata quanto maggiore il contenuto di goetite (Liu et al., 1994). Quasi

tutti gli ossidi di ferro esistono in forma cristallina. Il grado di cristallizzazione e la grandezza del cristallo dipendono dalle condizioni in cui si è formato il cristallo stesso. La struttura degli ossidi di ferro è stata determinata principalmente mediante diffrazione ai raggi X (XRD) dei monocristalli o per diffrazione dei neutroni, con informazioni supplementari ottenuti mediante altri metodi di caratterizzazione quali: spettroscopia all'infrarosso e microscopia elettronica ad alta risoluzione (Cornell and Schwertmann, 1996).

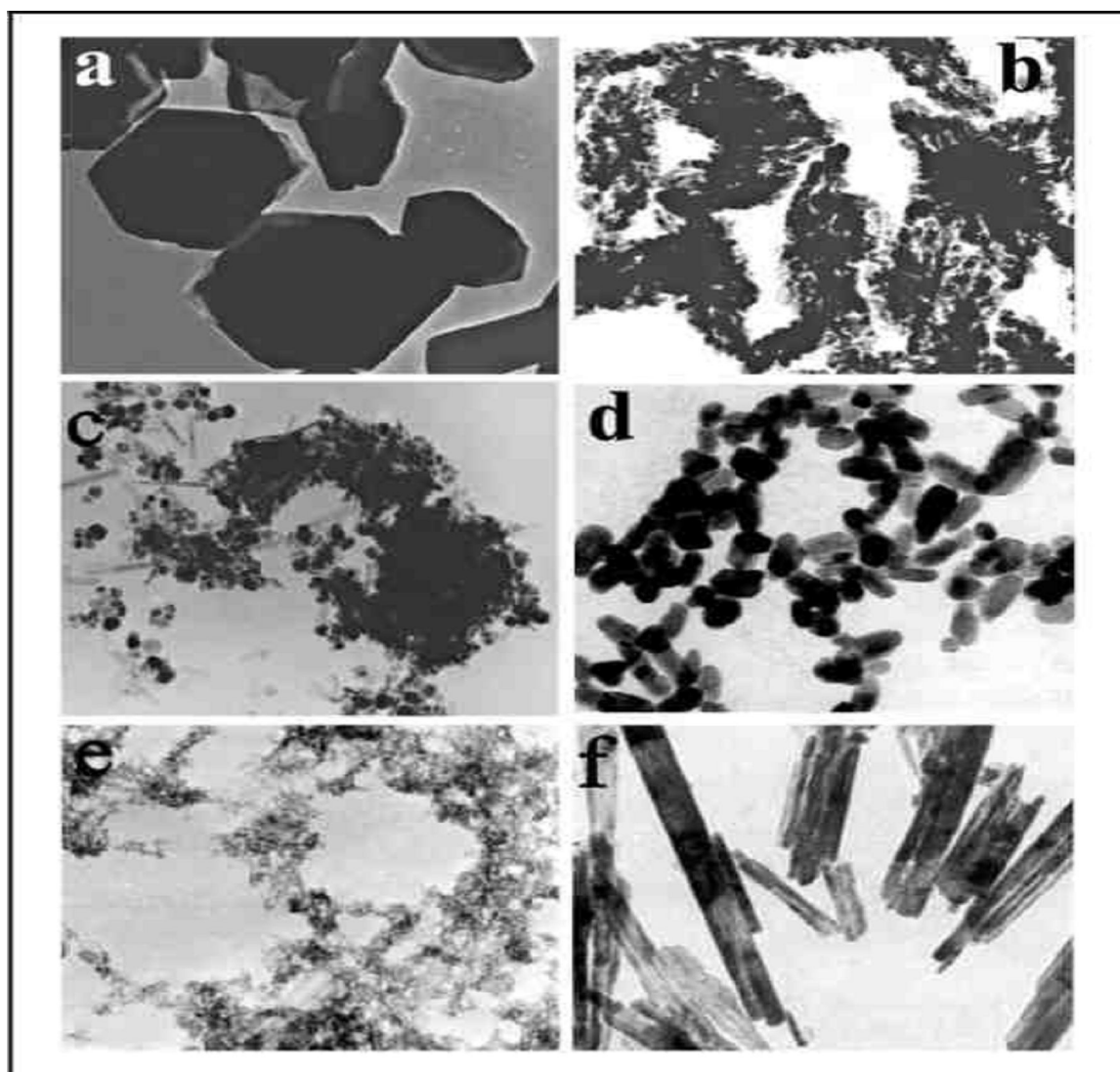


Figura 1.4: Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di: a) ematite; b) ematite sintetizzata in presenza di ossalato; c) goethite e maghemite; d) goethite; e) ferridrite; f) lepidocrocite.

1.5.1.2. Ossidi di alluminio

Gli idrossidi di alluminio cristallizzano in tre diversi polimorfi: gibbsite [g-Al(OH)_3], bayerite [a-Al(OH)_3] e nordstrandite [Al(OH)_3] (Fig. 1.5.a-d). La gibbsite è un minerale comune nei suoli tropicali e subtropicali, ed è presente soprattutto negli Oxisuoli ed in misura minore negli Ultisuoli (Hsu, 1989). La gibbsite è raramente ritrovata come componente pedogenetico dei suoli nelle zone a clima temperato e in questi, l'alluminio mobilizzato dall'attacco acido sui minerali, può ritrovarsi precipitato come allofane, imogolite o come precipitato in composti a scarso ordine cristallino o interstratificato come alluminio tra gli strati espandibili dei silicati. La gibbsite cristallizza usualmente in forma esagonale (Fig. 1.5.b) ed è presente in molti Oxisuoli (lateriti, suoli lateritici e latosuoli) che di solito si riscontrano in regioni umide tropicali e subtropicali.

La nordstrandite e la bayerite si ritrovano raramente in natura; la loro apparente rarità nei suoli potrebbe essere dovuta alla difficoltà di identificarli per la loro bassa quantità e/o perché mascherati dalla presenza di gibbsite (Fig. 1.5.a, c-d). La bayerite è facilmente sintetizzabile in laboratorio; essa cristallizza di solito in grossi cristalli triangolari (1-5 mm) (Fig. 1.5.a). La nordstrandite, sintetizzata per la prima volta da Van Nordstrand nel 1956, è stata poi riscontrata in suoli alcalini e in importanti depositi bauxitici. Essa cristallizza in assenza di minerali argillosi, in cristalli rettangolari, ma in presenza di leganti organici e di fillosilicati presenta morfologia ovoidale (Fig. 1.5.c) o mostra cristalli molto allungati (Fig. 1.5.d).

La boehmite (AlOOH – ossidrossido di alluminio) si trova spesso associata con gibbsite e/o nordstrandite nelle bauxiti. In molti depositi dell'area del Mediterraneo essa è di solito il principale minerale dell'alluminio ed è costituita da particelle di dimensioni estremamente ridotte. In laboratorio ossidrossidi di alluminio, formati a temperatura e

pressione ambiente, appaiono a scarso ordine cristallino e sono noti con il termine di pseudoboehmiti (Fig. 1.5.e). Questi componenti presentano un aspetto gelatinoso e mostrano diffrattogrammi simili a quelli delle boehmiti, ma con picchi molto slargati. Oltre a materiali cristallizzati e a scarso ordine cristallino predominano nei suoli ossidi idrati amorfi, spesso associati a sostanze organiche, la cui natura non è ben definita, ma che esplicano un ruolo fondamentale sulle proprietà chimico-fisiche e sulla reattività dei suoli (Fig. 1.5.f).

E' stato dimostrato che la cinetica di formazione della bayerite è estremamente veloce, e la sua cristallizzazione sarebbe quindi facilitata in ambienti fortemente alcalini ed in presenza di basse concentrazioni di leganti con scarsa affinità per l'alluminio. Viceversa la gibbsite si formerebbe molto lentamente, particolarmente a pH acidi, o anche a pH alcalini, ma in presenza di leganti e minerali argillosi capaci di rallentare notevolmente le reazioni idrolitiche dell'alluminio. La nordstrandite si formerebbe in condizioni intermedie, particolarmente a pH alcalini ed in presenza di leganti con forte affinità per l'alluminio.

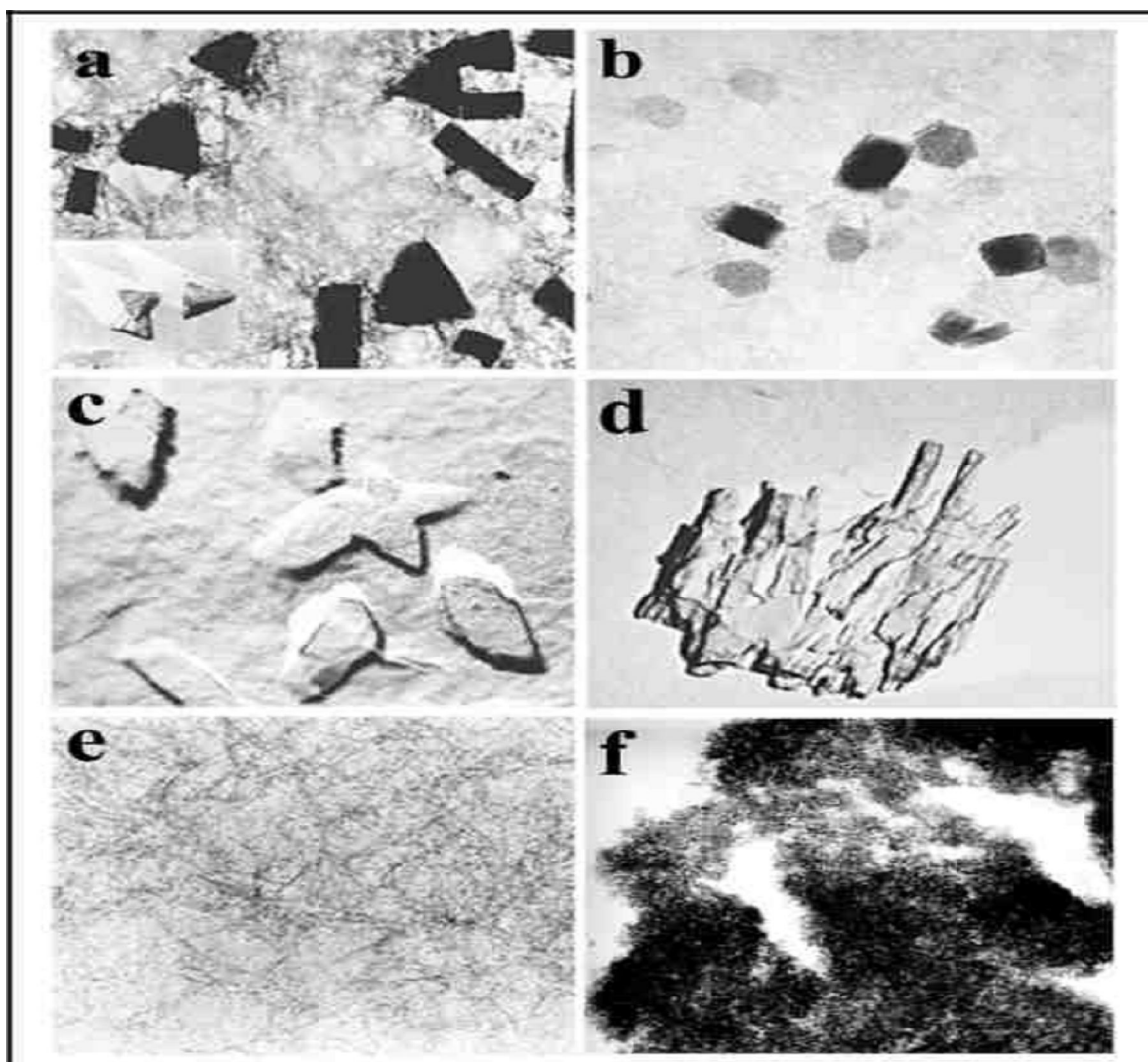


Figura 1.5: Micrografie al microscopio elettronico a trasmissione (TEM) di: a) bayerite; b) gibbsite; c) nordstrandite; d) nordstrandite sintetizzata in presenza di argilla; e) pseudoboehmiti; f) materiale non cristallino.

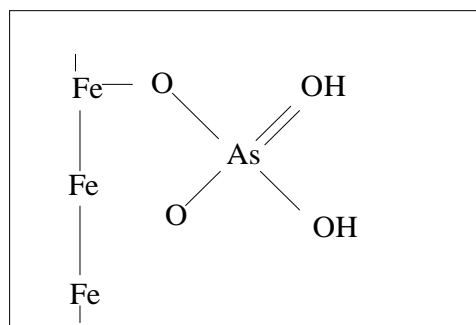
1.5.2. Chimica di superficie e reattività dei minerali a carica variabile

Le specie idrolitiche del ferro, dell'alluminio e del manganese cristalline, criptocristalline o non cristalline presenti negli ambienti naturali come fasi separate o fissate sulle superfici dei minerali, presentano elevata capacità di adsorbire anioni inorganici ed organici, cationi, macromolecole, quali enzimi, polisaccaridi, nucleotidi e sostanze xenobiotiche. La loro capacità di adsorbire è tanto maggiore quanto minore il loro grado di cristallizzazione e quindi più elevata risulta la loro area superficiale o quando i loro gruppi reattivi sono maggiormente esposti. La carica superficiale di tali minerali è dovuta alla presenza di acqua gruppi $-OH_2$ carichi positivamente e

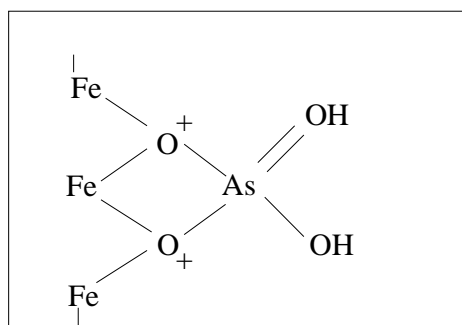
OH^- negativi ed è, quindi pH dipendente. Essa diventa tanto più positiva quanto minore il pH della soluzione. Avendo gli ossidi punto di carica zero particolarmente elevati ($p_{cz} > 7.0$), negli ambienti naturali essi si comportano prevalentemente come colloidali positivi. Tuttavia anioni organici ed inorganici fissati sulle loro superfici possono abbassare il punto di carica zero verso valori più bassi. Recenti studi hanno evidenziato, utilizzando metodologie EXAFS (X-ray adsorption fine structure), che ioni arseniato vengono adsorbiti sulle superfici dei minerali a carica variabile formando “inner-sphere complexes” ovvero legami di coordinazione molto forti (Sparks, 1995). Tali legami possono essere monodentati (Fig. 1.8.a), bidentati mononucleari (Fig. 1.8.b) e/o bidentati binucleari (Fig. 1.8.c) in proporzioni differenti a seconda delle caratteristiche delle superfici degli adsorbenti.

La formazione di legami monodentati sembra essere correlata ad un'elevata concentrazione di ioni, mentre i legami bidentati si formano soprattutto in condizioni di “surface coverage” (saturazione delle superfici) inferiore al 100%. Esperimenti condotti sulla cinetica di adsorbimento di ioni arseniato su alcuni minerali a carica variabile (ferridrite, gibbsite) hanno evidenziato che con il passare del tempo di contatto tra gli ioni arseniato e le superfici degli adsorbenti, i legami monodentati possono trasformarsi in legami bidentati (Sparks, 1995).

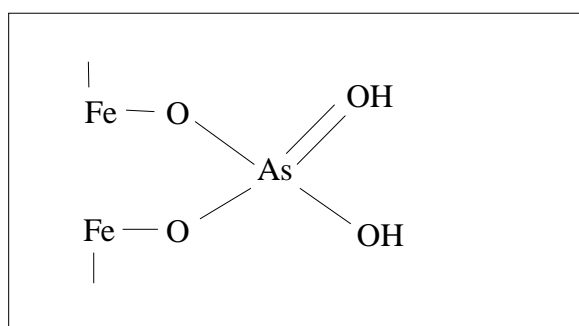
Anche la natura degli adsorbenti riveste un ruolo fondamentale per quanto concerne l'adsorbimento dell'arsenico. Recenti studi condotti su ossidi di ferro, alluminio e manganese hanno evidenziato che ioni arseniato sono adsorbiti con maggiore affinità sugli ossidi di manganese e ferro piuttosto che su quelli di alluminio (Violante e Pigna, 2002).



a) Legame monodentato



b) Legame bidentato mononucleato



c) Legame bidentato binucleare

Figura 1.6: Possibili complessi di superficie ("Inner-Sphere complexes") di ioni arseniato su di un minerale a carica variabile.

1.5.3. Competizione arseniato-fosfato nei suoli

Il comportamento chimico dello ione arseniato è molto simile a quello del fosfato, difatti entrambi gli anioni sono adsorbiti in maniera specifica dai costituenti del suolo formando sulle superfici dei minerali a carica variabile (ossidi di alluminio, ferro, manganese, allofane, imogolite) legami molto stabili di tipo inner-sphere (Sun e Doner, 1996; O'Reilly et al., 2001; Liu et al., 2001).

La mobilità dell'arsenato nel suolo in presenza di ioni fosfato è influenzata da numerosi fattori, quali: il pH, il rapporto molare arseniato/fosfato, la natura e le proprietà degli adsorbenti e il tempo di

contatto tra gli anioni e le superfici adsorbenti. L'applicazione di ingenti quantità di fertilizzanti fosfatici (pratica estremamente diffusa in agricoltura intensiva) può avere un ruolo importante nel rilascio di ioni arseniato e arsenito nella soluzione circolante, influenzando, quindi, anche sulla biodisponibilità di questo elemento per le piante (Peryea, 1991).

È stato osservato che il fosfato desorbe l'arsenico adsorbito dai costituenti del suolo (Woolson et al., 1973; Peryea, 1991; Violante e Pigna, 2002). Elevate aggiunte di fosfato a suoli inquinati determinano uno spostamento anche elevato dell'arsenico presente, e la frazione di arsenico liberata viene in parte riadsorbita, in parte assorbita dai vegetali e in parte lisciviata lungo il profilo del suolo (Woolson et al. 1973).

1.5.4. Adsorbimento anionico

Nell'ambiente suolo, gli acidi organici, i tannini, gli acidi umici e fulvici hanno un doppio ruolo: possono ostacolare o promuovere l'adsorbimento degli anioni sui colloidi del suolo. Gli acidi organici a basso peso molecolare come il malico, il citrico, l'aspartico, l'ossalico ed il tannico, promuovono la formazione di siti attivi per l'adsorbimento modificando la struttura dei prodotti di precipitazione ed aumentando la loro superficie specifica. La stabilità della struttura dei prodotti di precipitazione con una elevata area superficiale, formati in presenza di concentrazioni critiche di alcune biomolecole, contribuisce a sviluppare una elevata capacità di ritenzione degli anioni da parte dei complessi organo-minerali (Huang and Violante, 1986; De Cristofaro et al., 2000).

I leganti organici con una forte affinità per il Fe (ossalato, citrato, tartrato e malato) sono fortemente adsorbiti e formano “inner-sphere complexes”. La funzionalità polidentata di molti composti organici è un importante fattore nel formare un forte legame di superficie. Leganti come

acetato, benzoato, e formato sono invece adsorbiti debolmente sulla superficie degli ossidi.

L'adsorbimento di composti organici di solito aumenta con il diminuire del pH. Anioni inorganici con moderata affinità per il Fe, come solfato, seleniato, silicato, sono adsorbiti debolmente formando legami di tipo “outer-sphere”. Questi anioni non sono adsorbiti a valori di $\text{pH} > 6.0 - 7.0$, e spesso sono facilmente rimossi dalle superfici dei minerali da leganti inorganici ed organici a più elevata affinità. Anioni inorganici con forte affinità per il ferro e l'alluminio, quali fosfato, molibdato, arseniato vengono adsorbiti fortemente e selettivamente spostando anioni più deboli precedentemente adsorbiti. Le specie adsorbite, quindi, non sono necessariamente le stesse inizialmente presenti in soluzione. Gli ioni fosfato sono adsorbiti anche a pH maggiori del punto di carica zero del minerale adsorbente. In molti complessi organo-minerali, gli anioni organici occupano molti siti di adsorbimento limitando di conseguenza l'adsorbimento di nutrienti. Sembrerebbe quindi che nella rizosfera il continuo rilascio di anioni organici da parte dell'apparato radicale delle piante e da microrganismi che vivono a stretto contatto con le radici, faciliti la rimozione di nutrienti dai colloidi del suolo o ne impedisca l'adsorbimento rendendoli in entrambi i casi più facilmente disponibili per la pianta. Tuttavia, è bene ricordare che i leganti organici possono facilitare la formazione di prodotti di precipitazione a scarso ordine cristallino, che mostrando area superficiale particolarmente elevata, adsorbono elevate quantità di anioni diversi.

1.5.5. Influenza di leganti organici ed inorganici sull'adsorbimento anionico

Nel suolo, gli acidi inorganici ed organici, hanno un doppio ruolo: possono ostacolare o promuovere la ritenzione degli anioni sui prodotti di

precipitazione dell'alluminio e del ferro. Leganti diversi promuovono la formazione di siti attivi per l'adsorbimento di nutrienti (fosfato, solfato) ed inquinanti (arseniato, cromato) modificando la struttura dei prodotti di precipitazione dell'alluminio e del ferro ed aumentando la loro superficie specifica. La stabilità della struttura dei prodotti di precipitazione con una elevata area superficiale, formati in presenza di concentrazioni critiche di alcune biomolecole, contribuisce a sviluppare una elevata capacità di ritenzione degli anioni da parte dei complessi organo-minerali (Huang and Violante, 1986; Violante and Huang, 1989; De Cristofaro et al., 2000).

I composti organici competono per i siti comuni sugli ossidi di Al e Fe ed inibiscono l'adsorbimento di altri leganti organici ed inorganici. Nagarajah et al. (1970) hanno trovato che la capacità competitiva degli acidi carbossilici nell'inibire l'adsorbimento del fosfato sulla gibbsite e sulla goethite è nel seguente ordine citrato > ossalato > malonato > tartrato > acetato.

Violante e Gianfreda (2000) hanno dimostrato che acidi organici con una forte azione legante, riducono fortemente l'adsorbimento di fosfato sui minerali a carica variabile presenti nei suoli.

Il citrato ed il tartrato inibiscono l'adsorbimento del fosfato sulla feridrite. Questo è anche il meccanismo con il quale le radici delle piante, rilasciando acidi mono- e di-carbossilici, mobilizzano il fosfato adsorbito e migliorano il proprio approvvigionamento di fosforo.

Inskeep (1989) e Liu et al. (1999) hanno dimostrato che alcuni acidi carbossilici così come gli acidi umici e fulvici, acido tannico e gallico prevengono l'adsorbimento del solfato sugli ossidi di ferro. Ossalato, tartrato, gluconato, malato e tiocianato causano una maggiore riduzione rispetto agli altri nell'adsorbimento del solfato. Una massima riduzione nell'adsorbimento del fosfato e del solfato si verifica quando i composti organici reagiscono con gli ossidi prima dell'addizione del fosfato e del solfato, in quanto per primi riescono ad occupare i siti di adsorbimento e a ridurre il PCZ.

1.5.6 Modelli matematici per la descrizione delle reazioni di adsorbimento

In termini quantitativi risulta difficile descrivere l'adsorbimento dell'As nel suolo a causa della coesistenza di numerose fasi adsorbenti e della difficoltà pratica di separare i fenomeni di adsorbimento da quelli di precipitazione. Sono state elaborate numerose equazioni in grado di descrivere i dati dell'adsorbimento: queste relazioni sono anche dette curve Q/I, dove il fattore quantità Q rappresenta la quantità adsorbita, mentre l'intensità I è la concentrazione in soluzione. Esse sono utili nel descrivere le proprietà adsorbenti del suolo e nel fare ipotesi sulle caratteristiche del suolo legate all'adsorbimento.

Tutte le curve utilizzate per descrivere l'adsorbimento derivano dall'equazione generale di Gibbs, che si basa su considerazioni termodinamiche. Tale equazione, detta isoterma di Gibbs, afferma che la quantità di sostanza adsorbita (X) è direttamente proporzionale alla concentrazione della sostanza in soluzione (C) e alla variazione della tensione superficiale con la concentrazione:

$$X = \frac{C}{RT} \cdot \frac{d\sigma}{dC}$$

Dove:

R = la costante dei gas;

T = la temperatura assoluta;

$d\sigma/dC$ = la variazione di tensione superficiale al variare della concentrazione.

Quest'equazione è però di scarsa utilità pratica perché il termine $d\sigma/dC$ non è facilmente determinabile. Sono state così elaborate equazioni più restrittive, tra cui le più usate nella scienza del suolo sono quelle di Freundlich e Langmuir (REF). Queste equazioni vengono definite isoterme perché gli esperimenti vengono condotti a temperatura costante.

L'equazione di Langmuir è rappresentata nella seguente forma lineare:

$$\frac{C}{X} = \frac{C}{X_{\max}} + \frac{1}{KX_{\max}}$$

Dove:

X = la quantità di sostanza adsorbita per unità di peso del suolo;

C = la concentrazione della soluzione all'equilibrio;

X_{max} = la massima quantità di As che può essere adsorbita

K (detta costante di Langmuir) = un parametro proporzionale all'energia di legame tra l'As e l'adsorbente.

Essa è ampiamente usata perché permette di calcolare il massimo di adsorbimento e di avere informazioni sull'energia di legame. Quest'equazione, sviluppata per descrivere l'adsorbimento di gas su superfici metalliche, si basa su tre presupposti:

- l'energia di adsorbimento è costante ed indipendente dalla progressiva saturazione della superficie;
- le molecole adsorbite non interagiscono tra di loro;
- l'adsorbato costituisce sulla superficie adsorbente uno strato monomolecolare, che rappresenta il massimo di adsorbimento possibile.

Tali presupposti non si verificano certamente per l'adsorbimento di As(V) e/o As(III) sul suolo e si riscontra che l'equazione di Langmuir può essere applicata solo entro un limitato campo di concentrazione, ciò nonostante essa si è rivelata essere un valido mezzo per riassumere le

informazioni ottenibili dalle isoterme di adsorbimento e per identificare le proprietà del suolo più coinvolte in tale fenomeno.

Lo studio delle cinetiche di reazione all'interfaccia solido-liquido per l'adsorbimento-desorbimento di arsenito e arseniato sui colloidi del suolo mostra che la velocità di reazione è elevata (Fiskell et Al., 1979; Griffin and Bureau, 1974; Huang, 1975). Pierce and Moore (1980) hanno osservato che il 90% dell'adsorbimento dell'arseniato su ossidi di Fe amorfi si completa in 15 min, con un massimo a pH 7.

1.6. Speciazione dell'arsenico

1.6.1. Studi sulla speciazione dell'arsenico nel suolo

Nei suoli e nei sedimenti, l'arsenico è presente principalmente in forme inorganiche, anche se alcuni autori hanno rilevato composti organici come il monometilarsonato (MMA) e il dimetilarsinato (DMA) (Pohl et al. 1986; Soderquist et al. 1974). Questi composti metilati possono provenire da reazioni di ossido-riduzione mediate da alcune specie di microrganismi. Viceversa alcuni composti metilati possono subire la reazione di demetilazione ad arsenico inorganico (Craig et al. 1986 ; Cullen et al. 1989 ; Salomons et al. 1995). La forma chimica dell'arsenico determina la sua mobilità dai suoli e sedimenti. (Huang et al. 1982). La conoscenza delle diverse forme chimiche dell'arsenico ci fornisce un valido strumento per la valutazione della sua mobilità verso la fase acquosa in equilibrio con il terreno o con i sedimenti. La speciazione dell'arsenico ha acquisito grande importanza negli ultimi anni, poiché la tossicità dell'arsenico varia drasticamente secondo le sue forme chimiche organiche e inorganiche (Irvin et al. 1995 ; Thomas et al. 2001). Oggi i meccanismi che originano la tossicità non sono stati ancora chiariti e attualmente sono in corso molti studi su questo argomento (Gebel et al. 2001; Tsunetoshi et al. 2000) per

sviluppare efficaci rimedi (Kosnett et al. 1998; Abernathy et al. 1999). Lo sviluppo di tecniche analitiche che permettano la speciazione chimica è un problema attuale poiché la determinazione dell'arsenico totale non può essere in molti casi una misura adeguata per valutare la tossicità o l'impatto ambientale di metalloide (Cullen et al. 1989). L'estrazione di specie chimiche è un argomento cruciale nello studio della speciazione degli elementi da matrici complesse in cui il sistema di estrazione dovrebbe fornire un buon recupero e preservare l'identità delle specie chimiche nel campione. La difficoltà dell'estrazione delle varie specie dell'arsenico dal suolo dipende dalla composizione dei suoli stessi e la presenza dei diversi minerali presenti influenza l'efficienza di estrazione (Garcia-Manyes et al. 2002). Per quanto riguarda le condizioni di estrazione, le microonde si rivelano una tecnica di successo per l'estrazione di specie elementari in genere e sono utilizzate anche per estrarre le specie di arsenico in matrici biologiche (Vilanò et al. 2000; Dagnac et al. 1999). Le tecniche maggiormente utilizzate per separare e nello stesso tempo determinare le specie dell'arsenico negli estratti ottenuti da campioni naturali anche a concentrazione molto basse sono i sistemi di separazione mediante cromatografia liquida (LC) con generazione di idruri (Hg) accoppiato alla spettrometria di assorbimento atomico (AAS), alla spettrometria di emissione atomica (AES), alla spettrometria di fluorescenza atomica (AFS) o spettrometria di massa accoppiato induttivamente al plasma (ICP-MS). Garcia-Manyes et al. (2002) hanno proposto un metodo di estrazione dell'arsenico da terreni e da sedimenti utilizzando una miscela di acido fosforico e acido ascorbico in microonde. Questi autori hanno utilizzato come tecnica per la speciazione di arsenico nei suoli estratti nella zona contaminata di Aznalcóllar (Spagna) (Vidal et al. 1999) l'accoppiamento LC-UV-HG-AFS. Recentemente Rahman et al. (2009) hanno sviluppato una procedura di estrazione MAE (Microwave Assisted Extraction) per le specie dell'arsenico nei suoli usando come soluzioni estraenti acido ortofosforico,

ammonio diidrogen fosfato e ammonio idrogen fosfato, ottenendo i migliori risultati di estrazione con la soluzione 1 M di acido orto fosforico mentre per la determinazione delle specie dell'arsenico negli estratti di suolo sono state determinate utilizzando IC-ICP MS.

1.6.2. Studi sulla speciazione dell'arsenico nella pianta

La determinazione delle varie specie dell'arsenico nel materiale vegetale è importante per capire in che forma il metalloide è metabolizzato dalle piante superiori. L'arsenico è presente nelle piante terrestri principalmente in forme inorganiche come l' arseniato e l' arsenito, anche se sono state identificate piccole quantità di specie organiche come l'acido dimetilarsenico (DMAA) e l'acido monometilarsenico (MMAA) (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002). Nei suoli areati l'arseniato essendo la specie più stabile e quindi maggiormente presente, rappresenta anche la forma di arsenico assunto in percentuale maggiore dalle piante, le quali sono in grado di metabolizzarlo riducendolo ad arsenito. Tale processo è ancora oggi oggetto di studio. Inoltre non è noto se le forme organiche ritrovate nei tessuti vegetali sono assorbite direttamente dal suolo o se sono adsorbite in forma inorganica e poi trasformate in forme organiche dalle piante stesse (Meharg e Hartley-Whitaker, 2002).

A partire dalla differente tossicità che le diverse specie dell'arsenico hanno per le piante e per gli uomini, informazioni sulla speciazione e la distribuzione dell'arsenico all'interno degli organismi viventi può aiutare a capire non solo come le piante trasformano e metabolizzano l'arsenico, ma anche a valutare il rischio connesso con l'ingresso dell' arsenico nella fauna selvatica e nella catena alimentare.

La speciazione è generalmente realizzata in tre fasi: preparazione del campione, estrazione delle specie e loro determinazione (Benramdane, et al., 1999). Il più importante passaggio del processo è senza dubbio la

preparazione dei campioni, dove è necessario estrarre quantitativamente l'arsenico dalla matrice-complesso biologico mantenendo al tempo stesso l'integrità delle specie chimiche. Finora la maggior parte dei lavori sono stati indirizzati alla speciazione dell'arsenico negli organismi marini (Maher, et al., 1988). L'uso di solventi organici come metanolo, metanolo-acqua o metanolo-acqua-cloroformio, in concomitante agitazione, sonicazione, e riscaldamento a microonde sono stati utilizzati con successo per estrarre principalmente le specie di arsenico organico da organismi marini, ma non sono risultati altrettanto efficaci nell'estrazione dell'arsenico dalle piante terrestri dove la maggior parte dell'arsenico è presente sotto forma di composti inorganici (Koch, et al., 2000).

Nelle piante, l'arsenito è fortemente legato a gruppi-SH delle proteine citosoliche e costituenti macromolecolari (Styblo, et al., 1996). Quindi, per estrarre l'arsenico (III) dal materiale vegetale terrestre, è necessario rompere il forte legame S-As (III). (Munoz, et al., 1999). Recentemente, sono state studiate diverse tecniche per estrarre le specie dell'arsenico da campioni vegetali terrestri. In particolare sono state utilizzate tecnologie di digestione enzimatica seguita da sonicazione con acetonitrile-acqua, estrazione accelerata con solvente e la digestione con acido trifluoroacetico dell'arsenico da campioni di mele, riso e steli di riso. E' importante sottolineare che la riduzione di As(V) ad As(III) è stata osservata quando è stato usato acido trifluoroacetico per il riso (Heitkemper, et al., 2001) e per gli steli di riso, mentre l'ossidazione di As(III) ad As(V) è stata osservata in una quantità nota di arsenico sottoposta a digestione enzimatica e sonicazione. (Caruso, et al., 2001). L'estrazione accelerata con acqua (Vela, et al., 2001) e l'estrazione assistita da microonde con metanolo-water (Helgesen e Larsen, E. 1998) sono state impiegate per estrarre le specie di arsenico da campioni di carote. Helgesen e Larsen (1998) hanno osservato basse efficienze di estrazione (46-69%) e una non comprovata stabilità delle specie di arsenico

durante l'estrazione a microonde. L'utilizzo dell' estrazione accelerata con solvente ha dato come risultato una scarsa efficienza di estrazione quando i campioni contenevano principalmente arsenico in forma inorganica (75-95%) (Vela, et al. 2001). Pertanto, le attuali tecniche di estrazione da materiale vegetale terrestre sono inadeguate e necessitano molti approfondimenti.

2.SCOPO

Negli ultimi anni sono stati accertati numerosi casi di inquinamento da arsenico (soprattutto in acque di falda) in diversi paesi nel mondo. La presenza di numerosi siti potenzialmente inquinati (circa 1.4 milioni) (European Topic Center Soil , 2002) da metalli pesanti con particolare riferimento all'arsenico ha suscitato l'interesse di diverse comunità. In Europa sono stati fatti grandi progressi nel ridurre gli input di arsenico nell'atmosfera soprattutto ad ovest del continente. Negli Stati Uniti, l' EPA nel 1997 ha impiegato circa il 41 % dei superfondi per la riqualificazione di siti contaminati da arsenico (USE EPA, 1997), secondo solamente al piombo, nella National Priority List (USE EPA 2004) dei principali contaminanti inorganici. Uno dei casi più drammatici di popolazione a rischio dalla presenza naturale di arsenico nelle acque di falda è rappresentato dal Bangladesh e dall' India orientale, dove milioni di persone usano acque con alte concentrazioni di arsenico.

Al fine di studiare i rischi legati all'assunzione dell'arsenico mediante ingestione di acque e/o alimenti contaminati, ho rivolto i miei studi sui fattori che influenzano la mobilità e la potenziale tossicità dell' arsenico nel sistema suolo- acqua - pianta. In particolare sono stati studiati, attraverso un approccio modellistico, i fattori che regolano l'adsorbimento di entrambe le forme inorganiche dell'arsenico (As III ed As V) su un ossido di ferro a scarso ordine cristallino (ferridrite $\text{Fe}_2\text{O}_3 \times n \text{H}_2\text{O}$) e su un ossido di alluminio amorfo in presenza di anioni inorganici (fosfato solfato, seleniato e selenito) e organici (malato, ossalato citrato e tartrato), presenti naturalmente in natura. L'adsorbimento ed il desorbimento dell'arsenico su e da diversi componenti del suolo può avere un ruolo importante nel regolare la mobilità dell'elemento negli ambienti naturali (suoli, sedimenti, acque).

Un altro aspetto del lavoro di tesi è stato quello di valutare l'assorbimento di arsenico da parte di piante di interesse alimentare (*Cichorium endivia* e *Zea mays*) coltivate su suoli naturalmente inquinati dal metalloide, campionati a Scarlino (Grosseto). Attraverso questa prova è stata testata la capacità della concimazione fosfatica e dei funghi micorrizici arbuscolari (FMA) nell'aumentare la tolleranza della pianta ospite alle condizioni di tossicità dovute dalla presenza del metalloide. Infatti tra i fattori che potrebbero influenzare l'acquisizione di arsenico da parte delle piante vi sono anche le micorrize. È stato infatti dimostrato che alcuni funghi micorrizici arbuscolari aumentano la tolleranza della pianta ospite alle condizioni di tossicità, inclusa la presenza di metalli pesanti, legandoli e limitandone la traslocazione germogli nella pianta (Joner e Leyval et al., 1997). Tuttavia, le informazioni sull'interazione FMA-As sono veramente limitate ed è necessario condurre ricerche più approfondite, in particolare per capire quali siano i meccanismi di protezione tramite i quali i funghi arbuscolari possono contribuire ad aumentare la tolleranza della pianta ospite in ambienti contaminati dal metalloide.

Per la maggior parte delle piante l'assorbimento dell'inquinante dipende da fattori ambientali, quali tipo di suolo, dotazione di nutrienti, pH del mezzo e soprattutto dalla presenza di fosforo. Infatti, l'arseniato, specie dell'arsenico dominante nel suolo in condizioni aerobiche, a causa della similarità chimica con il fosfato, è assorbito dalle piante attraverso il sistema di trasporto del fosfato. Inoltre la presenza del fosforo può, come conseguenza della competizione As-P per i siti di adsorbimento sui costituenti del suolo, determinare un aumento della biodisponibilità e della concentrazione di As nelle piante. Per quanto riguarda la prova sperimentale su *Zea mays* particolare cura è stata posta nella determinazione nei diversi strati della rizosfera delle varie specie dell'arsenico e della frazione biodisponibile del metalloide attraverso

l'uso di campionatori passivi DGT (Diffusive gradient in thin film) . Le piante sono state cresciute in particolari dispositivi (rhizobox), i quali consentono attraverso l'uso di apparecchiature idonee il campionamento meticoloso del suolo rizosferico. I processi chimici e biologici che avvengono nella rizosfera possono influenzare la conversione delle specie chimiche dell'arsenico e la loro biodisponibilità per le piante. Sebbene l'arseniato sia la specie maggiormente presente in condizione aerobiche può accadere che la presenza di micropori anaerobi specialmente nella rizosfera dove l'attività microbica ed il consumo di ossigeno è alto, può causare un'interconversione dell'arseniato ad arsenito. Diversi studi hanno mostrato, attraverso l'uso di spettrometria ai raggi X, che la maggior parte (circa il 70- 80%) di arsenico assorbito dalle placche di ossidi di ferro formatesi sulle radici di *Phalaris arundinacea*, *Typha latifolia* e riso era presente sotto forma di arseniato, mentre la restante parte (circa 20-30 %) era presente sotto forma di arsenito (Hansel et al. 2002; Blute et al., 2004; Liu et al. 2006). Probabilmente la presenza di arsenito può essere dovuta all'attività delle radici , che assorbono arsenico sotto forma di arseniato e lo espellono nella rizosfera in forma ridotta, detossificandosi in questo modo dall'inquinante.

Inoltre al fine di ottenere utili informazioni sul metabolismo dell'arsenico nelle piante di *Zea mays* ho eseguito la speciazione del metalloide nei loro tessuti (radici e germoglio). Xu et al. (2007) hanno osservato nelle piante di pomodoro e riso una quantità di arsenito pari al 97-100% dell'arsenico totale sia nelle radici che nelle foglie. Anche Pickering et al . (2000) hanno scoperto, attraverso sperimentazione su *Brassica juncea* che le piante riuscivano ad accumulare nelle foglie circa il 98% dell'arsenico sottoforma di arsenito. Questi studi mostrano come alcune piante in seguito all'assorbimento di arseniato siano in grado di ridurlo in maniera efficiente ad arsenito.

3. MATERIALI E METODI

3.1 PREPARAZIONE DEGLI OSSIDI

3.1.1 Preparazione della ferridrite

La ferridrite è stata preparata titolando una soluzione 0,1 M di $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ con NaOH 0,5 M ad una velocità di $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ fino a pH 5,5. La sospensione è stata tenuta per alcuni giorni sotto agitazione a temperatura ambiente ed è stata quindi dializzata e liofilizzata.

3.1.2 Preparazione dell'ossido di alluminio

L'ossido di alluminio a scarso ordine cristallino $\text{Al}(\text{OH})_x$ è stato acquistato dalla Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wi, USA).

3.2. ANALISI CHIMICHE SUGLI OSSIDI

3.2.1. Area superficiale

La determinazione dell'area superficiale degli ossidi è stata effettuata secondo la metodica di Quirk (1955). I campioni sono stati equilibrati prima in un essiccatore con P_2O_5 fino ad ottenere peso costante (WA), riequilibrati in un essiccatore con una soluzione di acetato di ammonio satura con umidità costante al 20% e pesati (WB). La quantità di H_2O adsorbita è stata determinata per differenza di peso ($\text{WB} - \text{WA}$). L'area superficiale è stata calcolata assumendo che $2,78 \times 10^{-4}$ grammi di acqua formano uno strato monomolecolare su un campione di 1 m^2 .

La formula utilizzata per la determinazione è stata:

$$A = \frac{[(W_b - W_a) \times 3,6 \times 1000]}{0,6}$$

dove:

A = area superficiale espressa in $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$;

W_b = peso dei campioni dopo riequilibratura su una soluzione di acetato di ammonio espresso in grammi al 20% di umidità relativa;

W_a = peso dei campioni dopo disidratazione su P_2O_5 espresso in grammi;

3,6 = superficie espressa in m^2 di un milligrammo di H_2O adsorbita sul campione;

0,2 = peso dei campioni espresso in grammi.

3.3. ANALISI MINERALOGICHE

3.3.1. Diffrazione ai Raggi X

I campioni sono stati macinati in un mortaio di agata fino al raggiungimento di una consistenza polverulenta. Il campione ottenuto è stato sottoposto ad analisi XRD random. Le analisi sono state condotte utilizzando un diffrattometro Rigaku Geigerflex D/max IIC con radiazione $\text{Cu-K}\alpha$ generata a 40 KV e 30 mA con una velocità di scansione di $1^\circ 2\theta \text{min}^{-1}$. I diffrattogrammi sono il risultato della somma di 8 scansioni.

3.3.2. Analisi all'infrarosso IR

L'analisi dei campioni è stata condotta utilizzando la metodologia "Drift" mediante apparecchio FTIR Perkin Elmer. In questo tipo di analisi risulta essere molto importante la preparazione del campione. Le analisi sono state eseguite su un milligrammo di ciascun campione previamente essiccato in stufa a 105°C per 24 ore in modo da eliminare l'acqua adsorbita. Successivamente i campioni sono stati mescolati con 200 mg di KBr in un mortaio di agata ed il miscuglio opportunamente omogeneizzato è stato utilizzato per l'analisi. Gli spettri sono stati studiati nell'intervallo 4000-400 cm⁻¹.

Il processo di preparazione del campione merita molta attenzione. Infatti, la maggioranza dei campioni di minerali deve essere esaminata previa polverizzazione, ed è essenziale ridurre le particelle a dimensioni inferiori ai 2μ. Particelle più grosse farebbero disperdere la radiazione infrarossa, riducendone l'energia trasmessa. Il processo di polverizzazione va effettuato con maggior cautela possibile: agire con un certo vigore potrebbe distruggere e deformare, in parte o in tutto, le strutture del cristallo. Tali effetti deleteri della macinazione si possono evitare, o considerevolmente moderare, umidificando il campione. Possono usarsi liquidi non rettivi od anche acqua. Campioni di minerali più teneri possono rapidamente e facilmente essere macinati in un mortaio di agata; minerali più duri richiedono un apposito mulino a vibrazione.

3.3.3. Microscopia elettronica a trasmissione (TEM)

Il TEM permette l'osservazione di campioni in un intervallo che va da 15 a 50.000 ingrandimenti e le immagini ricavate hanno un potere di risoluzione dipendente dal tipo di campione e dal voltaggio applicato. Il

microscopio a trasmissione consente di ottenere immagini a due dimensioni di campioni molto sottili.

L'impiego di tale apparecchiatura richiede un'adeguata preparazione del campione. Essi infatti vengono comunemente osservati sospesi tra le maglie di un retino sopra una sottilissima membrana di collodio, carbone o materiale plastico polivinilico.

3.4. ISOTERME DI ADSORBIMENTO

Sui campioni oggetto di studio, sono state preliminarmente condotte isoterme di adsorbimento di ioni arsenito e arseniato a pH 6,0 al fine di conoscere le quantità massime di anioni adsorbiti dai materiali adsorbenti.

Le isoterme di adsorbimento sono state realizzate somministrando a 100 mg di ciascun ossido, setacciato a 0,315 mm e tenuto in stufa a 100°C per un'ora, quantità crescenti di ioni As(V) e As(III) a pH costante pari a 6,0.

Gli esperimenti sono stati condotti in KCl 0.02 M (volume finale 20mL) al fine di mantenere costante la forza ionica. Il pH delle sospensioni è stato a pH 6.0 aggiungendo HCl o NaOH 0.01 M. Dopo 24 ore di agitazione su piastra magnetica le sospensioni sono state centrifugate a 10.000 giri per 20 minuti e filtrate con filtri Millex GS, Millipore (Bedford, U.S.A.) con diametro dei pori inferiore a 0.2 μm . La quantità di ciascun anione adsorbito è stata calcolata per differenza tra la concentrazioni inizialmente aggiunta al campione e la concentrazione rilevata nel surnatante mediante cromatografia ionica (cromatografo Dionex DX-120).

3.4.1. Adsorbimento competitivo di ioni arseniato e/o arsenito con anioni inorganici ed organici

Sono state condotte prove di adsorbimento competitivo di ioni arseniato e arsenito con anioni inorganici (fosfato, solfato, selenito e seleniato) e organici (ossalato, malato, tartrato citrato) aggiunti contemporaneamente a rapporto molare iniziale leganti/As = 1 e a rapporto molare iniziale leganti/As = 2.

Le prove sono state condotte a pH 6,0 e la competizione è stata valutata dopo 5 e 24 ore di contatto tra gli anioni e le superfici degli adsorbenti. Gli esperimenti sono stati condotti in KCl 0.02 M (fino ad un volume finale di 20 ml). Il pH delle sospensioni è stato mantenuto costantemente a un valore pari a 6,0 aggiungendo HCl o NaOH 0.01 M. Al termine della prova le sospensioni sono state centrifugate a 10.000 giri per 20 minuti e filtrate con filtri Millex GS, Millipore (Bedford, U.S.A.) con diametro dei pori inferiore a 0.2 μm .

Le quantità di AsV e AsIII adsorbite sono state calcolate come sopra descritto.

3.5 LA SPERIMENTAZIONE IN VASO

3.5.1 Inquadramento geomorfologico dell'area campionata

Il suolo inquinato da arsenico impiegato per la sperimentazione in vaso è stato campionato a Scarlino, in provincia di Grosseto (Toscana), dove si riscontra una marcata presenza del metalloide, nei suoli, a causa della concomitante azione di fattori naturali ed antropici.

Scarlino si colloca nella parte pianeggiante (Piana di Scarlino) del bacino idrografico del Fiume Pecora, un'ampia area che si estende tra Follonica a sud, Gavorrano e Massa Marittima ad est, Monte Arsentì a nord, e Montioni ad ovest. La fascia collinare che limita il bacino del Pecora si raccorda con gradualità all'area di fondovalle. Questa si presenta ampia e pianeggiante nella parte bassa, più stretta nella parte medio-alta del bacino. I corsi d'acqua più importanti del bacino idrografico della Val di Pecora sono: il Fiume Pecora ed il Canale Allacciante, che hanno un alveo pensile sulla Piana di Scarlino. Il Fiume Pecora nasce dal Monte Arsentì ad una quota di circa 400 metri s.l.m. e dopo un percorso di circa 25 km in direzione sud-ovest sfocia nel Padule di Scarlino. Il Canale Allacciante scavato durante le opere di bonifica raccoglie le acque provenienti dal versante Gavorrano-Scarlino e sfocia in mare presso la località Puntone (Tanelli et al., 2003)

3.5.2 Modalità di campionamento del suolo inquinato

Il suolo utilizzato per le prove sperimentali di crescita della Scarola e del Mais è stato campionato in località del Casone dove nel 1962 entrò in funzione il primo stabilimento industriale della piana di Scarlino, lo stabilimento Montedison che produceva pellet di ossidi di ferro e acido solforico a partire dalla pirite.

Il prelievo, in un unico campione, del suolo inquinato è stato realizzato (circa 200 kg) con attrezzi manuali nei primi 30 cm di profondità. Da tale campione è stato prelevato un sub-campione rappresentativo il quale è stato diviso in tre aliquote sulle quali sono state effettuate le analisi chimico-fisiche di base per la caratterizzazione del suolo in esame.

3.5.3 Analisi chimico-fisiche del suolo campionato

Le analisi chimiche e fisiche dei campioni di suolo sono state eseguite secondo quanto previsto rispettivamente dai “Metodi ufficiali di analisi chimica del suolo” (MUACS) D.M. del 13/09/99 (riportati in Gazzetta Ufficiale n.185 del 21 ottobre 1999) e dai “Metodi ufficiali di analisi fisica del suolo” (MUAFS) D.M. del 01/08/97 (riportati in Gazzetta Ufficiale n.204 del 2 settembre 1997).

3.5.3.1 Analisi fisiche

3.5.3.1.1 Determinazione della granulometria

La determinazione si basa sul prelievo della sospensione di particelle con diametro inferiore a 200 μm a diverse altezze ed a tempi prestabiliti. Per separare le diverse frazioni di particelle è stato necessario fissare il tempo di prelevamento, influenzato da: temperatura, profondità, massa volumica reale delle particelle. Il contenuto delle varie frazioni granulometriche è stato espresso in g kg^{-1}

3.5.3.1.2 Determinazione della conduttività elettrica

La conduttività elettrica è stata determinata strumentalmente su estratto acquoso del suolo in rapporto acqua/soilo 5:1. Sul filtrato è stato rilevato il valore di conduttività, utilizzando Conduttimetro (Crison EC-Meter Basic 30+) che fornisce direttamente i valori riportati a 25°C, espresso in $\mu\text{S cm}^{-1}$.

3.5.3.2 *Analisi chimiche*

3.5.3.2.1 *Determinazione del calcare totale*

Il contenuto di calcare totale dei suoli è stato determinato indirettamente misurando, per via gas-volumetrica, la CO_2 che si libera trattando un campione di terra fine (2 g) con una quantità nota di una soluzione diluita (1:1 v v⁻¹) di acido cloridrico. La misurazione è stata effettuata adoperando il calcimetro di Dietrich-Fruehling. Il contenuto di calcare totale è stato espresso in g kg⁻¹.

3.5.3.2.2 *Determinazione del carbonio organico e della sostanza organica*

Il carbonio organico è stato determinato con il metodo Walkley-Black. Il metodo prevede l'ossidazione del carbonio organico ad anidride carbonica con 10 mL di una soluzione di bicromato di potassio 0,167 M in presenza di 20 mL di acido solforico al 96% ($\rho=1,835$). Dopo 30 minuti, la reazione viene interrotta mediante aggiunta di 200 mL di H_2O deionizzata e la quantità di potassio bicromato che non ha reagito viene determinata per titolazione con una soluzione di ferro II solfato eptaidrato 0,5 M. La titolazione viene eseguita con l'aggiunta di qualche goccia di indicatore di ossidoriduzione preparato sciogliendo 0,2 g di sodio 4 difenilamminosolfonato in acido solforico(H_2SO_4) [96% ($\rho=1,835$)].

Il contenuto di carbonio organico è stato calcolato mediante una formula che tiene conto della quantità di campione pesata (2 g) e della quantità di titolante utilizzata. I risultati sono stati espressi in g kg⁻¹ di suolo.

$$C = \frac{3}{2} \times \frac{(B - A)}{1000} \times \frac{MFe}{6} \times 12 \times \frac{1000}{m} \times 1.3$$

dove:

C = contenuto di carbonio organico, espresso in g kg^{-1}

$3/2$ = rapporto molare della reazione di ossido riduzione (2 moli di potassio bicromato reagiscono con 3 moli di C)

B = volume della soluzione di ferro(II) solfato utilizzato nella titolazione della prova in bianco, espresso in millilitri

A = volume della soluzione di ferro (II) solfato utilizzato nella titolazione della soluzione del campione, espresso in millilitri

$MFe(II)$ = molarità effettiva della soluzione di ferro (II) solfato

12 = peso atomico del carbonio, espresso in g mol^{-1}

1.3 = fattore di correzione empirico che tiene conto della parziale ossidazione (70%) del carbonio organico

m = massa del campione di terra fine, espressa in grammi

da cui:

$$C = \frac{3.9 \times (B - A) \times MFe(II)}{m}$$

Considerando pari al 58% il contenuto medio di carbonio nella sostanza organica, è possibile utilizzare il fattore 1,724 per trasformare i g kg^{-1} di carbonio organico determinati nel corrispondente contenuto di sostanza organica.

3.5.3.2.3 Determinazione della capacità di scambio cationico (C.S.C.)

Il campione di suolo (1 g) viene monosaturato con bario per ripetuti trattamenti di agitazione e centrifugazione a 3000 rpm con una soluzione di bario cloruro e trietanolammina a pH 8,2. Successivamente, al campione Ba-saturato vengono aggiunti 25 ml di una soluzione di magnesio solfato 0,05 M. La reazione porta alla formazione di solfato di bario insolubile e, quindi, allo scambio completo Ba/Mg. L'eccesso di magnesio in soluzione viene determinato per titolazione con EDTA 0,025 M (acido etilendiamminotetracetico). Calcolata la quantità di magnesio adsorbito, che corrisponde alla quantità di bario scambiato, si accerta il valore della capacità di scambio cationico. La C.S.C. è stata espressa in centimoli per kg di suolo ($\text{cmol}_{(+)} \text{ kg}^{-1}$) o in milliequivalenti per 100 g di suolo ($\text{meq } 100 \text{ g}^{-1}$). I due valori risultano numericamente uguali.

3.5.3.2.4. Determinazione delle basi di scambio

Gli ioni calcio, magnesio, potassio e sodio, vengono rimossi dai siti di scambio di 1,5 g di campione di suolo con 50 ml di una soluzione di bario cloruro e trietanolammina a pH 8,2. Dopo agitazione di un'ora a $150 \text{ giri min}^{-1}$. L'estratto ricavato, viene poi filtrato con carta Whatman n°42. Il contenuto di calcio e magnesio viene determinato per spettrofotometria in assorbimento atomico con atomizzatore a fiamma (FAAS), sul filtrato ricavato, diluito di cento volte, a cui viene aggiunto una quantità nota di lantanio (50 g L^{-1}). Il contenuto di potassio e sodio viene determinato sempre attraverso spettrofotometria in assorbimento atomico con atomizzatore a fiamma (FAAS), sul filtrato ricavato, diluito però di sole dieci volte, a cui viene aggiunto una quantità nota di cesio (10 g L^{-1}).

Lo strumento utilizzato nelle determinazioni è stato il Perkin Elmer Instrument - Atomic Absorption Spectrometer - AAnalyst 700. Il contenuto di ciascun catione di scambio è stato espresso in milliequivalenti per 100 g di suolo ($\text{meq } 100\text{g}^{-1}$).

3.5.3.2.5. Determinazione del fosforo totale

L'estrazione del fosforo totale dai campioni di suolo è stata effettuata mediante mineralizzazione con una miscela di acido nitrico al 65% ($\rho=1,400$) e acido cloridrico 37% ($\rho=1,168$) in rapporto 1:3 su 500 mg di campione pesati in contenitori di polipropilene privo da contaminanti con graduazione in Classe "A" fino a 50 mL secondo le specifiche ASTM. I contenitori sono stati riscaldati per 120 minuti a 95°C in digestore modello DigiPREP Jr (SCP Science). Gli estratti sono stati portati a 50 mL con acqua deionizzata, filtrati e conservati in bottiglie di polietilene alla temperatura di 4°C fino alla determinazione del fosforo. La concentrazione del fosforo negli estratti è stata determinata attraverso l'utilizzo di ICP-OES (Perkin Elmer modello Optima 2000 DV). Il contenuto di fosforo è stato espresso in g kg^{-1} .

3.5.3.2.6 Determinazione del fosforo assimilabile

Tale determinazione è stata eseguita apportando piccole modifiche al metodo Olsen. La metodologia Olsen si basa sull'estrazione del fosforo dal campione di suolo con una soluzione di sodio bicarbonato. La concentrazione in fosforo della soluzione ottenuta viene determinata per via colorimetrica, utilizzando la formazione del complesso fosfomolibdico di colore blu in presenza di acido ascorbico.

Il suolo (circa 3 g) viene trattato con 30 ml di una soluzione 0,5 M di sodio bicarbonato a pH 8,5 dopo 30 minuti di agitazione a 150 rpm e 15 min

di centrifugazione a 3500 rpm l'estratto viene filtrato con carta Whatman n°42. Successivamente, viene trasferito in un matraccio tarato da 50 mL, 5 mL di filtrato, a cui si aggiungono 8 mL del reattivo solfomolibdico, per lo sviluppo della tipica colorazione blu. La determinazione è stata eseguita per spettrofotometria con l'impiego di uno spettrofotometro Perkin-Elmer Instrument, Lambda 25, UV-VIS Spectrometer. Il contenuto di fosforo è stato espresso in mg kg^{-1} .

3.5.3.2.7 Determinazione dell'arsenico totale

L'arsenico totale è stato estratto dai campioni di suolo mediante mineralizzazione con una miscela di acido nitrico al 65% ($\rho=1,400$) e acido cloridrico 37% ($\rho=1,168$) in rapporto 1:3. Gli acidi sono stati purificati con la tecnica sub-boiling (US-EPA SW-846) con l'unità della ditta Milestone modello SubPUR. La concentrazione di As totale sui campioni di suolo è stata determinata attraverso spettrometria di massa ICP-MS (Agilent 7500ce). I segnali dell'As (m/z 75) e del Cl (m/z 35) sono stati osservati e le possibili interferenze poliatomiche di ArCl (m/z 75) sono state rimosse dall'Octopole Reaction System operando in modalità di gas He.

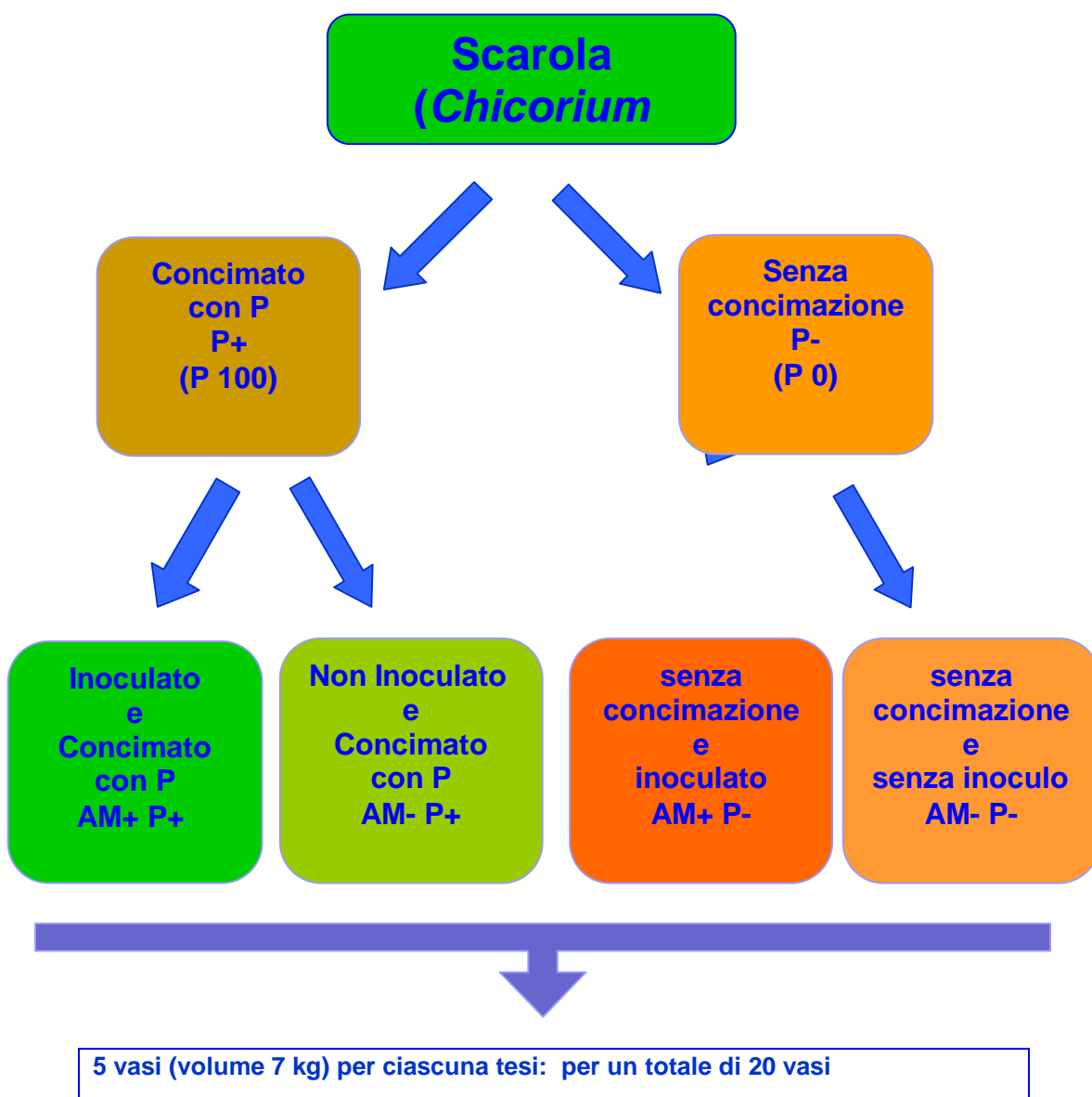
3.5.4. Prova sperimentale in vaso su *Chicorum indivia*

Le prove di crescita sono state condotte sul suolo prelevato a Scarlino, caratterizzato da un contenuto di arsenico di circa 300 mg kg^{-1} . Il suolo è stato omogeneizzato rompendo gli aggregati più grossi.

La scarola è stata allevata in serra e seminata per un periodo di quattro mesi, inizialmente in contenitore alveolare, ponendo circa tre semi di scarola per foro. Una metà del contenitore è stata preparata con una miscela di suolo e micorrize (*Glomus intraradices*), l'altra metà esclusivamente con suolo.

Dopo circa 30 giorni dall'emergenza, le piante sono state trapiantate in vasi contenenti circa 7 kg di suolo, trapiantando una sola pianta per vaso, e ponendo, nei vasi preparati per le piantine già micorrizate in contenitore, alcuni grammi d'inoculo micorrizico.

Tra le piantine trapiantate in vaso solo alla metà (incolate e non incolate con micorrize) ho somministrato anche la concimazione fosfatica. Sono state quindi allestite quattro differenti tesi in cinque repliche, per un totale di 20 vasi così distribuiti:



3.5.4.1. Micorrize

Per la micorrizzazione delle piante oggetto di studio, è stato adoperato un inoculo commerciale di funghi endomicorrizici arbuscolari fornito dalla ditta Italtollina s.p.a., in formulato microgranulare, con un numero di propaguli infettivi per grammo pari a 100. L'inoculo utilizzato è formato da ceppi di funghi, tra i quali, il più importante, per effetto e quantità, è il *Glomus intraradices*. Tale fungo ha una capacità infettiva e un'efficacia superiore a quella di molte altre specie fungine. Inoltre è una specie autoctona del Mediterraneo, quindi ben adattata al clima della nostra regione. Il prodotto è stato applicato in fase di semina, mescolandolo al suolo preparato per riempire il contenitore alveolare, e in fase di trapianto, collocando il prodotto immediatamente sotto le piantine in modo tale da rendere il contatto tra l'inoculo e la pianta più diretto possibile.

3.5.4.2. Campionamento delle piante

Le piante di Scarola sono state raccolte poco prima dell'emissione dello scapo floreale per consentire, in tal modo, il massimo accumulo dell'inquinante nelle foglie.

In seguito alla raccolta, le piante sono state divise in radici e foglie. Dopo aver determinato il peso fresco, i vari tessuti vegetali sono stati lavati ed essiccati in stufa ventilata a 50°C fino al raggiungimento di peso costante; a questo punto, è stato misurato anche il peso secco. I tessuti vegetali essiccati sono stati macinati e ridotti in polvere, mediante polverizzatore (Pulverisette), in modo da renderli omogenei ed idonei ai successivi trattamenti di analisi in laboratorio.

3.5.4.3. Determinazione della concentrazione di arsenico totale e fosforo totale

L'estrazione del fosforo e dell'arsenico dai campioni (foglie e radici) è stata effettuata mediante mineralizzazione con una miscela di acido nitrico al 65% ($\rho=1,400$) e perossido di idrogeno in rapporto 3:1 su 500 mg di campione pesati in contenitori di polipropilene privo da contaminanti con graduazione in Classe "A" fino a 50 mL secondo le specifiche ASTM. I contenitori sono stati riscaldati per 120 minuti a 95°C in digestore modello DigiPREP Jr (SCP Science). Gli estratti sono stati portati a 50 mL con acqua deionizzata, filtrati e conservati in bottiglie di polietilene alla temperatura di 4°C fino alla determinazione del contenuto dei diversi elementi. La concentrazione di As totale sui campioni di suolo, sulle foglie e sulle radici dei vegetali è stata determinata attraverso spettrometria di massa ICP-MS (Agilent 7500ce).

I segnali dell'As (m/z 75) e del Cl (m/z 35) sono stati osservati e le possibili interferenze poliatomiche di ArCl (m/z 75) sono state rimosse dall'Octopole Reaction System operando in modalità di gas He. La concentrazione del fosforo degli estratti è stata determinata attraverso l'utilizzo di ICP- OES (Optima 2000 DV, Perkin Elmer).

Per verificare l'accuratezza della procedura analitica sono stati analizzati dei campioni di riferimento certificati di trifoglio (BCR 402- White Clover) e di lichene (C.R.M. BCR 482- Lichen). I vari contenuti dei diversi elementi determinati, sono stati espressi in mg kg^{-1} . Laddove tali valori sono risultati elevati, si è preferito esprimerli in g kg^{-1} .

3.5.5. Prova sperimentale su *Zea Mays* cresciuta in rhizobox

Le prove di crescita sono state condotte sul suolo campionato a Scarlino (300 mg kg⁻¹ di As). Il suolo è stato disaggregato, setacciato e miscelato con sabbia in proporzione 2 parti suolo una parte sabbia in modo da rendere più agevole la preparazione dei rhizobox.

Per ciascun compartimento suolo-pianta dei rhizobox sono stati posti 6 semi di mais. Sei rhizobox sono stati preparati con una miscela di suolo e micorrize, gli altri sei esclusivamente con suolo. Dei dodici rhizobox totali solo sei hanno ricevuto la concimazione fosfatica.

In conclusione, sono state allestite quattro differenti tesi in tre replicati, per un totale di 12 rhizobox così distribuiti:

- piante allevate in presenza di micorrize e di concimazione fosfatica (M+P+) (3 rhizobox)
- piante allevate in assenza di micorrize e di concimazione fosfatica (M-P-) (3 rhizobox)
- piante allevate in presenza di micorrize ed assenza di concimazione fosfatica (M+P-) (3 rhizobox)
- ed altre in assenza di micorrize e presenza di concimazione fosfatica (M-P+) (3 rhizobox).

Le piante di mais sono state fatte crescere per un periodo di cinque settimane in un fitotrone modello BINDER GmbH alternando 11 ore di buio (temperatura minima raggiunta: 20 ° C) a 13 ore di luce (temperatura massima raggiunta: 27 ° C).

3.5.5.1. I rhizobox

Per la prova sperimentale sul mais ho utilizzato un nuovo design di rhizobox progettato da studiosi austriaci, descritti da Wenzel et al. (2001). Questo particolare dispositivo consente di campionare il suolo rizosferico con grande facilità grazie alla membrana di nylon con porosità di 30 μ che funge da setto di separazione tra le radici ed il suolo rizosferico.

La struttura dettagliata del rhizobox è mostrata in figura 3.1. Il dispositivo consiste in un compartimento suolo-pianta (fig 3.1), in uno stretto compartimento di sole radici e in un compartimento di suolo rizosferico (fig 3.1). Il fondo del compartimento suolo- radici presenta una stretta fessura, attraverso la quale le radici della pianta possono penetrare verticalmente formando un piano di radici confinante da un lato con una finestra trasparente di acrilico (fig 3.1) e da un altro lato con una membrana di nylon (fig 3.1) inibente la penetrazione nel compartimento del suolo rizosferico.

Mentre il compartimento del suolo rizosferico insieme alla membrana di nylon viene ben fissato, la finestra di acrilico è semimobile potendosi spostare in linea orizzontale sotto sollecitazioni provocate dall'accrescimento delle radici della pianta. La tensione che si crea tra la finestra di acrilico e la membrana di nylon è controllata da una vite regolabile (8 fig 3.1), provvista di un meccanismo di resistenza.

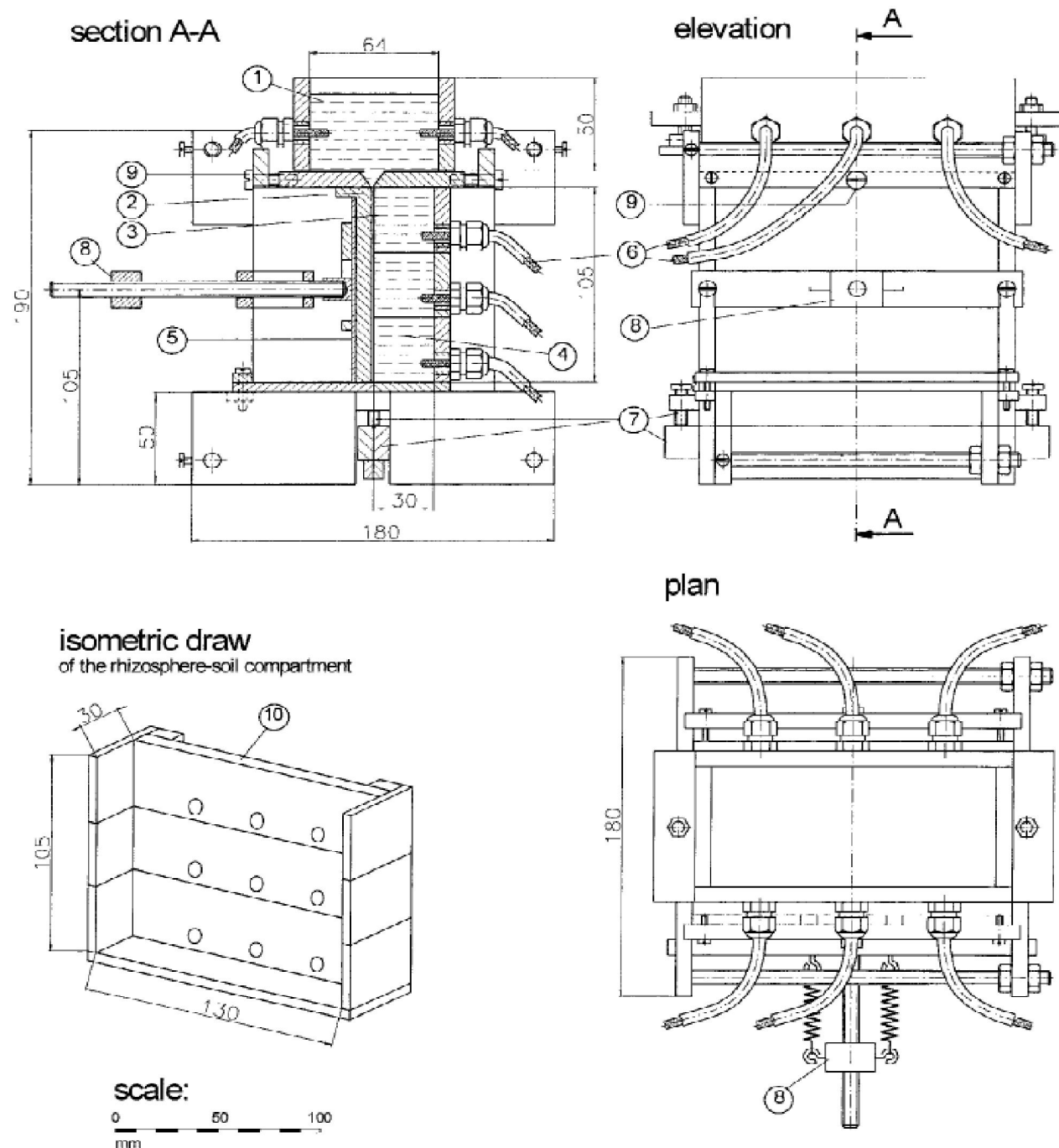


Figura 3.1 Sezioni del dispositivo rhizobox. Legenda: (1) compartimento suolo-pianta; (2) finestra trasparente di acrilico; (3) membrana di nylon; (4) compartimento del suolo rizosferico; (5) copertura rimuovibile della finestra trasparente di acrilico; (6) stoppini di irrigazione (diametro 5 mm); (7) dispositivo stringente la membrana; (8) dispositivo stringente la finestra trasparente di acrilico; (9) vite che regolare l'ampiezza della fessura dove penetrano le radici tra la finestra di acrilico e la membrana; (10) compartimento suolo rizosferico.

3.5.5.2. Le micorrize

Per la micorrizzazione delle piante di mais, è stato adoperato lo stesso inoculo commerciale impiegato per la prova sperimentale sulla scarola e fornito dalla ditta Italtollina s.p.a., ovvero l'inoculo formato da ceppi di funghi, tra i quali, il più importante, per effetto e quantità, è il *Glomus intraradices*. Il prodotto è stato applicato in fase di semina, collocando il prodotto immediatamente sotto le piantine in modo tale da rendere il contatto tra l'inoculo e la pianta più diretto possibile.

3.5.5.3. Campionamento del suolo rizosferico

Il dispositivo impiegato per la crescita del mais oltre a tenere separate le radici dal compartimento suolo rizosferico ha consentito di monitorare facilmente la crescita, la morfologia delle radici e quindi la loro disposizione lungo il piano verticale. Alla fine dell'esperimento, dopo circa 4 settimane dalla penetrazione delle radici attraverso la fessura aperta, il compartimento del suolo rizosferico è stato aperto.

Il campionamento del suolo rizosferico è stato effettuato per mezzo di apposito dispositivo a tre differenti distanze dalle radici:

- lo strato rizosferico ovvero quello più vicino alle radici (0-2 mm)
- lo strato rizosferico più lontano dalle radici (2-10 mm)
- lo strato del Bulk soil (> 10 mm)

Sui campioni di suolo così ottenuti è stata eseguita la determinazione dell'arsenico disponibile mediante l'uso di tecnologia Diffusive Gradient in Thin films (DGT).

3.5.5.4 Campionamento delle piante

Le piante sono state campionate dopo 5 settimane dalla germinazione. In seguito alla raccolta, le piante sono state divise in radici e foglie. Dopo aver determinato il peso fresco, i vari tessuti vegetali sono stati lavati ed essiccati in stufa ventilata a 40°C fino al raggiungimento di peso costante; a questo punto, è stato misurato anche il peso secco. I tessuti vegetali essiccati sono stati macinati e ridotti in polvere, mediante mulino planetario con giare e sfere di agata (Fritsch, Pulverisette 6), in modo da renderli omogenei ed idonei ai successivi trattamenti di analisi in laboratorio.

3.5.5.5. Determinazione della concentrazione di arsenico totale e fosforo totale

L'estrazione del fosforo e dell'arsenico dai campioni (foglie e radici) è stata effettuata mediante mineralizzazione con una miscela di acido nitrico al 65% ($\rho=1,400$) e perossido di idrogeno in rapporto 3:1 su 500 mg di campione pesati in contenitori di polipropilene privo da contaminanti con graduazione in Classe "A" fino a 50 mL secondo le specifiche ASTM. I contenitori sono stati riscaldati per 120 minuti a 95°C in digestore modello DigiPREP Jr (SCP Science). Gli estratti sono stati portati a 50 mL con acqua deionizzata, filtrati e conservati in bottiglie di polietilene alla temperatura di 4°C fino alla determinazione del contenuto dei diversi elementi. La concentrazione di As totale delle foglie e delle radici dei vegetali è stata determinata attraverso spettrometro di massa ICP-MS (Agilent 7500ce). Le possibili interferenze poliatomiche di ArCl (m/z 75) sono state rimosse dall'Octopole Reaction System operando in modalità di gas He. La concentrazione del fosforo degli estratti è stata determinata attraverso l'utilizzo di ICP- OES (Perkin Elmer, Optima 2000 DV)

Per verificare l'accuratezza della procedura analitica sono stati analizzati dei campioni di riferimento certificati di trifoglio (BCR 402- White Clover) e di lichene (C.R.M. BCR 482- Lichen). I vari contenuti dei diversi elementi determinati, sono stati espressi in mg kg^{-1} . Laddove tali valori sono risultati elevati, si è preferito esprimerli in g kg^{-1} .

3.5.5.6 Determinazione dell'arsenico disponibile nel suolo rizosferico mediante l'uso di tecnologia Diffusive Gradient in Thin films (DGT)

Gli studi sulla biodisponibilità dell'arsenico nel suolo rizosferico di *Zea mays* sono stati eseguiti attraverso l'impiego di una tecnica innovativa, chiamata Diffusive Gradient in Thin films (DGT, Davison e Zhang, 1994), che permette di misurare le specie labili degli ioni nei sedimenti e nei suoli (Zhang et al., 1995), direttamente in situ. La tecnica DGT si basa sull'impiego di un semplice dispositivo che, dopo la diffusione attraverso un idrogel, che funge da strato di diffusione, accumula soluti in uno strato di gel costituito da ossido di ferro (impregnato di ferrihydrite) utilizzato come agente adsorbente per l'arsenico (Zhang, et al. 1994). Il tutto è ricoperto da una membrana di nylon (porosità di $0.45 \mu\text{m}$), inerte all'assorbimento dell'arsenico, di spessore pari a $0,1 \text{ mm}$, con funzione di protezione, posta sulla parte superiore del gel diffusivo. Ciascun campione di terreno (circa 2 g) è stato posto sui dispositivi DGT utilizzando una piastra di acrilico appositamente progettata quando si dispone di piccole quantità di suolo (Firtz et al. 2003) (figura 3.2). In seguito il terreno è stato inumidito con acqua distillata. Per una corretta riuscita dell'esperimento è fondamentale che l'umidità del suolo non sia inferiore all'80 % della capacità di campo.

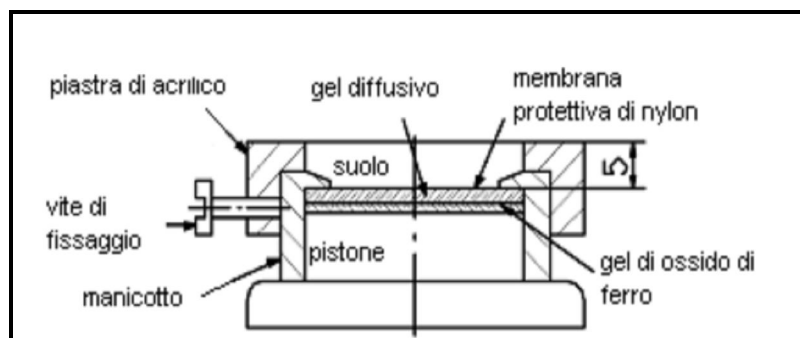


figura 3.2. profilo di dispositivo DGT con piastra di acrilico adattato per piccole quantità di suolo

In questo modo si riesce ad ottenere una buona diffusione della soluzione presente nelle intercapedini del suolo verso il gel dell'ossido di ferro. Successivamente le unità DGT sono state tenute in stufa a 23 ° C per 24 ore. I dispositivi sono stati aperti e da essi è stato recuperato il gel dell'ossido di ferro, il quale è stato posto in un tubo sterile da 10 mL e digerito con una soluzione di acido solforico 0,25 M. La quantità di arsenico presente nelle soluzioni è stata determinata attraverso spettrometria di massa ICP-MS (Agilent 7500ce).

La massa del metalloide nel gel è stata ricavata usando la seguente equazione:

$$M = \frac{Ce \times (V_{acid} + V_{gel})}{fe}$$

Dove :

M = Massa dell'arsenico nella resina

Ce= Concentrazione dell'arsenico nella soluzione di acido solforico 0,25 M

V_{acid} = Volume della soluzione di acido solforico 0,25 M

V_{gel} = Volume del gel di ossido di ferro (tipicamente 0,25 mL)

fe = fattore diluizione

Mentre la concentrazione dell'arsenico misurata dai DGT (C_{DGT}) è stata calcolata usando la seguente equazione:

$$C_{DGT} = \frac{M \times \Delta g}{D \times t \times A}$$

Dove:

Δg = spessore del gel diffusivo (0.08 cm) più lo spessore della membrana filtro (0,014 cm)

D = è il coefficiente di diffusione dell'arsenico nel gel a 23 °C ($5.69 \pm 0.14 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)

t = tempo di contatto

A = superficie di contatto (3,14 cm^2)

3.5.5.7. Speciazione dell'arsenico

3.5.5.7.1 Estrazione delle specie dell'arsenico dal suolo

Le specie dell'arsenico sono state estratte dal suolo oggetto di studio attraverso un attacco acido in forno a microonde (Rahman et al. 2009). Ai campioni di suolo (circa 0,5 g), posti in contenitori in PTFE, sono stati aggiunti 10 mL di acido ortofosforico 1 M. La miscela è stata sottoposta ad un trattamento blando alle microonde (60 W) per 10 minuti. I recuperi sono stati di circa il 90% rispetto l'As totale. Per verificare che il trattamento di

estrazione non avrebbe influenzato l'interconversione delle specie nei campioni aggiunto sono state aggiunte quantità note di soluzioni contenenti arsenito ed arseniato in rapporto 1:1.

3.5.5.7.2 Estrazione delle specie dell'arsenico dai vegetali

I campioni di foglie e radici (circa 0,5- 0,1 g) sono stati agitati in agitatore a scosse (140 rpm) per 16 minuti in 10 mL di una soluzione estraente composta da acqua:metanolo in rapporto 9:1 v/v. Gli estratti sono stati centrifugati per 5 minuti a 3000 rpm ed infine il surnatante è stato filtrato attraverso filtri di nitrato di cellulosa con diametro dei pori di 0,45 μm .

3.5.5.7.3 Determinazione delle specie dell'arsenico

Le specie dell'arsenico nei campioni di suolo e vegetali è stata determinata mediante l'uso di HPLC-ICP-MS (Agilent LC1100 serie e ICP-MS Agilent 7500ce), con un metodo simile al metodo descritto da Xu et al.(2007). Le specie dell'arsenico sono state separate usando una colonna a scambio anionico specifica per l'arsenico (Agilent G3154-65.001) munita di una precolonna (Agilent G3154-65.002). La fase mobile utilizzata è stata una soluzione di tampone fosfato (2 mM NaH_2PO_4 , 0.2 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ pH 6.0), pompata all'interno della colonna isocraticamente (1 mL min^{-1}).

L'uscita della colonna di separazione è stata collegata al nebulizzatore ed alla spray chamber dell'ICP-MS. I segnali dell'arsenico ($m/z = 75$) e del cloro ($m/z = 35$) sono stati individuati e le possibili interferenze poliatomiche dell'addotto ArCl ($m/z = 75$) sono state rimosse dal sistema Octopole Agilent operando in modalità di gas elio. Le aree dei picchi individuati sono state confrontate con quelle degli standard. Le specie dell'arsenico nei

campioni sono stati quantificati per mezzo di curve di calibrazione. Il metodo è stato efficace nel preservare gli stati di ossidazione As(V) o As(III) delle specie di arsenico nei campioni. Le analisi sono state effettuate subito dopo il campionamento e le estrazioni delle specie presenti nei campioni.

4. RISULTATI, DISCUSSIONI E CONCLUSIONI

4.1. Reattività di anioni As(III) e As(V) su ossidi di Fe e di Al

4.1.1. Ossido di ferro

Nelle Figure 4.1 e 4.2 sono riportati il diffrattogramma e lo spettro IR dell'ossido di ferro. Il precipitato di ferro, ottenuto a pH 5.5 e non invecchiato, ha mostrato ai raggi X e all'IR rispettivamente picchi a 0.254, 0.225, 0.197, 0.149 nm (fig 4.1) e bande slargate a circa 3430, 3300, 680, 450 cm^{-1} (Figura 4.2) caratteristici di ferridrite a scarsissimo ordine cristallino.

Il grado di cristallinità della ferridrite naturale o di sintesi può essere molto variabile. I due estremi sono la "2-line ferridrite" che mostra ai raggi X solo due picchi molto slargati a circa 0.260 e 0.150 nm e la "6-line ferridrite" che presenta ulteriori picchi a circa 0.221, 0.196, 0.172 e 0.148 nm. La ferridrite da noi sintetizzata, pur non presentando un grado di cristallinità estremamente basso, come appare evidente dal suo diffrattogramma (4 picchi chiaramente visibili; Figura 4.1), è tuttavia definibile come un precipitato a scarsissimo ordine cristallino poiché la banda IR centrata a circa 3300 cm^{-1} appare particolarmente ampia.

Al microscopio elettronico questo materiale è apparso costituito da particelle sferiche di dimensioni inferiori a circa 10 nm fortemente aggregate le une alle altre. Infatti nello spettro IR di questo ossido appare evidente un'intensa banda a 1625 cm^{-1} dovuta alla alta capacità di questo materiale di trattenere molecole di acqua adsorbite sulle superfici esterne. Inoltre, nello spettro IR è risultata presente un'intensa banda a 1384 cm^{-1} dovuta a presenza di anioni nitrato adsorbiti sulle superfici di questo materiale scarsamente cristallino. È noto che anioni inorganici, quali nitrato, nitrito, cloruro, perclorato etc, possono essere debolmente adsorbiti soltanto su minerali a carica variabile caratterizzati da elevato disordine strutturale.

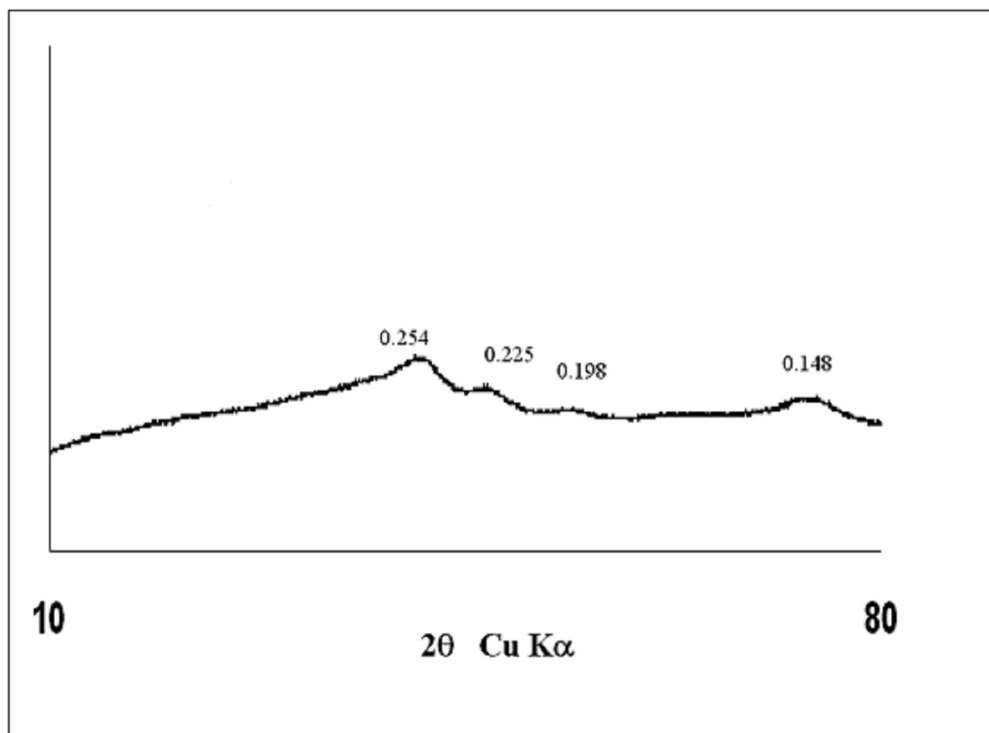


Figura 4.1. Diffratogramma della ferridrite

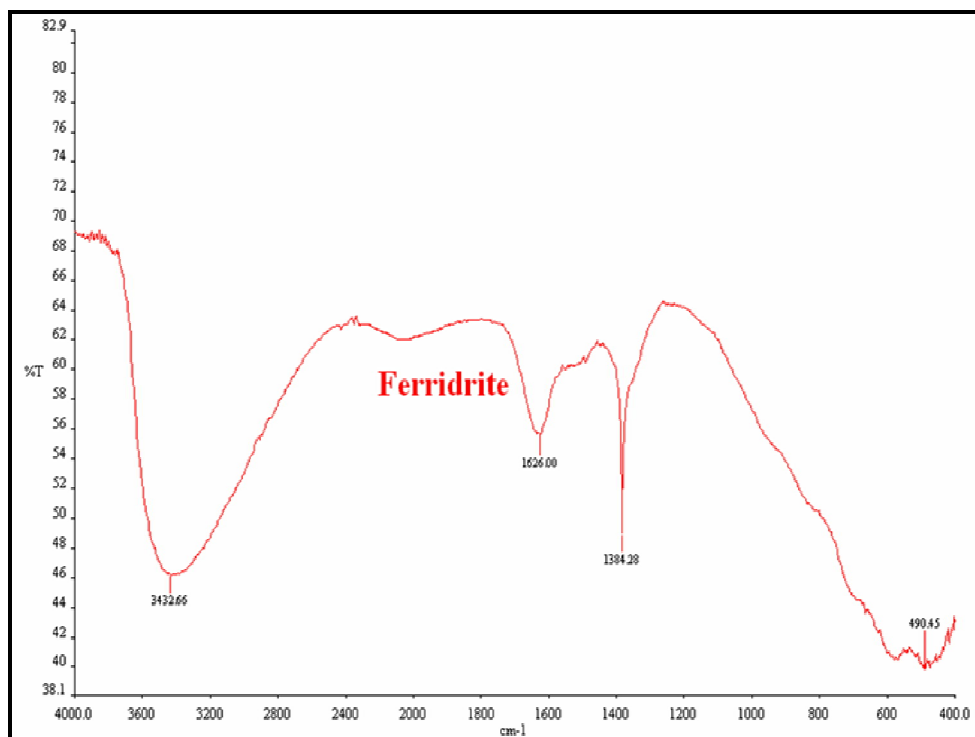


Figura 4.2. Spettro IR della ferridrite

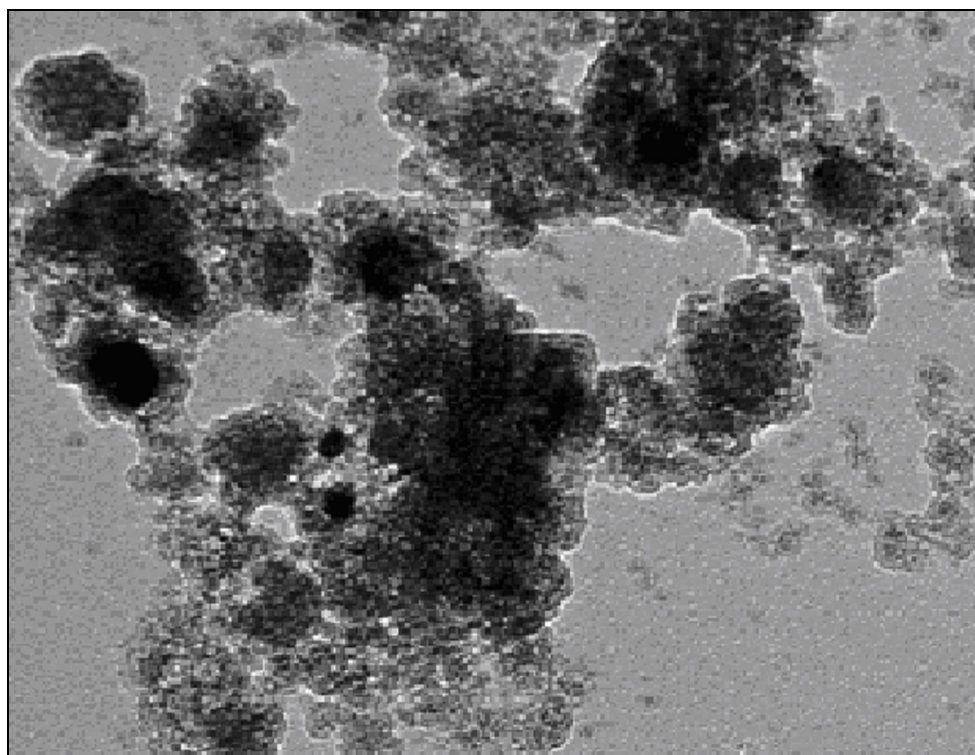


Figura 4.3. Micrografia a trasmissione della ferridrite

4.1.2. Ossido di alluminio

Nelle Figure 4.4 e 4-5 sono riportati rispettivamente il diffrattogramma e lo spettro IR dell'ossido di alluminio a scarso ordine cristallino. L'ossido è risultato costituito da materiale non cristallino come appare evidente dal diffrattogramma completamente piatto (Figura 4.4)

La natura non cristallina dell'ossido di alluminio è confermata dall'analisi IR. Come appare evidente dalla intensa banda centrata a circa 3460cm^{-1} (Figura 4.5). È noto infatti, che la presenza di bande intense e molto slargate a $3400\text{-}3500\text{ cm}^{-1}$ è indice di materiale a scarso ordine cristallino (Hsu, 1989). Lo spettro IR ha altresì evidenziato la presenza di acqua adsorbita come risulta evidente dalla forte banda a circa 1525 cm^{-1} .

In figura 4.6 è mostrata la micrografia del campione di alluminio amorfo Al(OH)_x dove si può osservare la presenza di aggregati esenti da forme geometriche ben definite segno evidente di materiale a scarsissimo ordine cristallino.

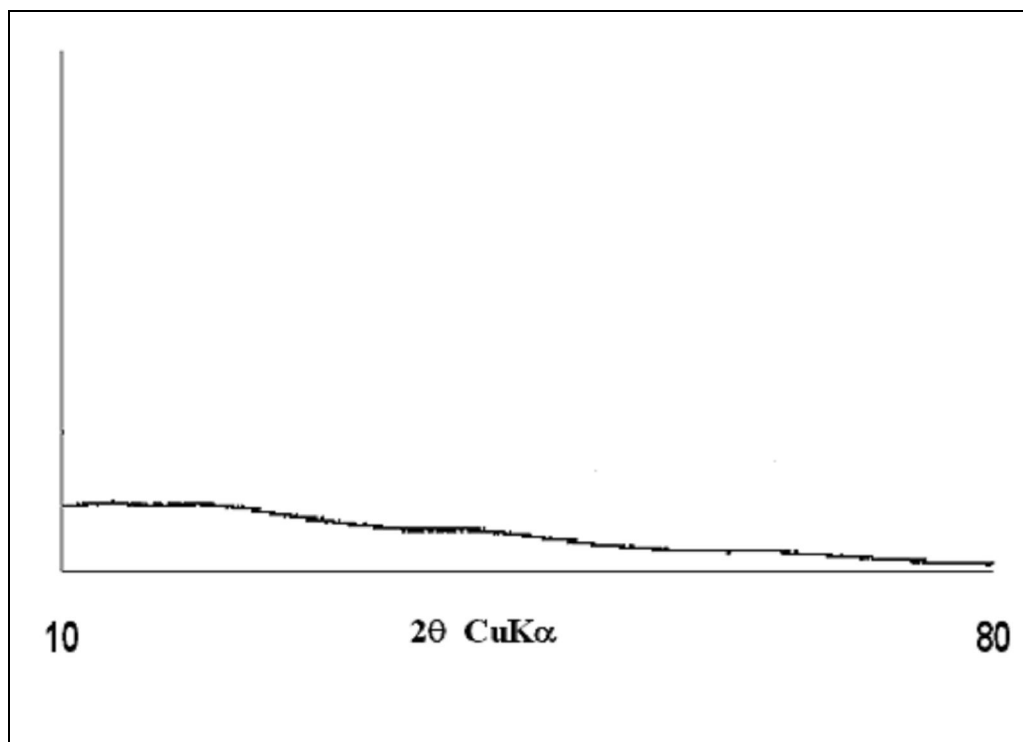


Figura 4.4. Diffrattogramma dell'ossido di alluminio Al(OH)_x

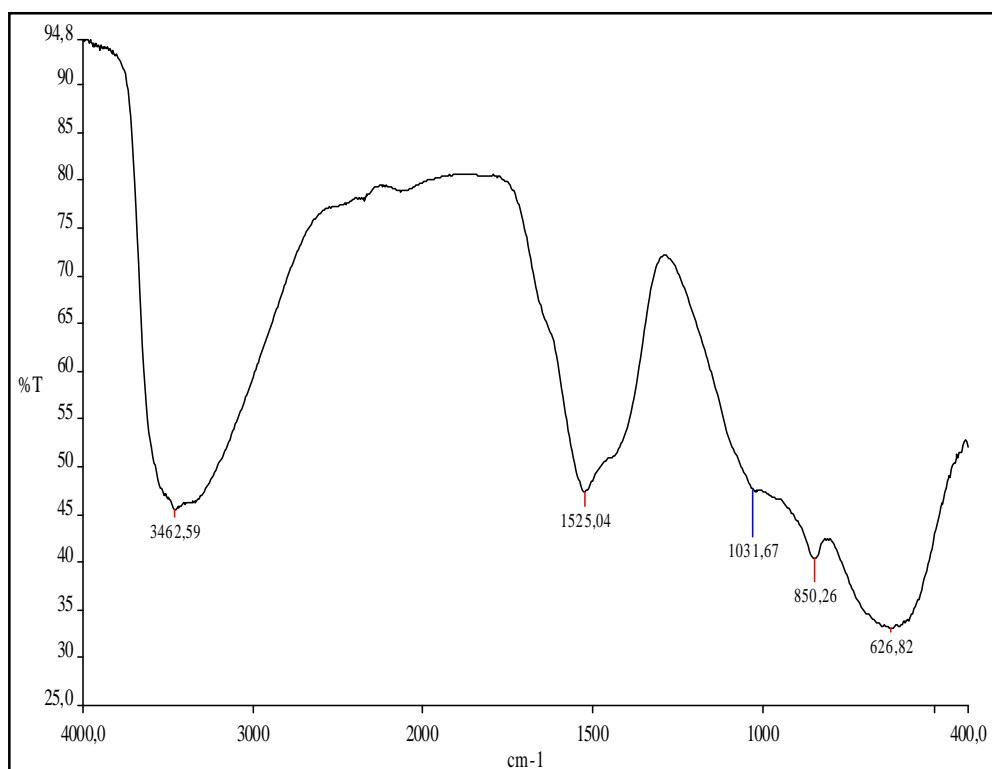


Figura 4.5 Spettro IR dell'ossido di alluminio Al(OH)_x

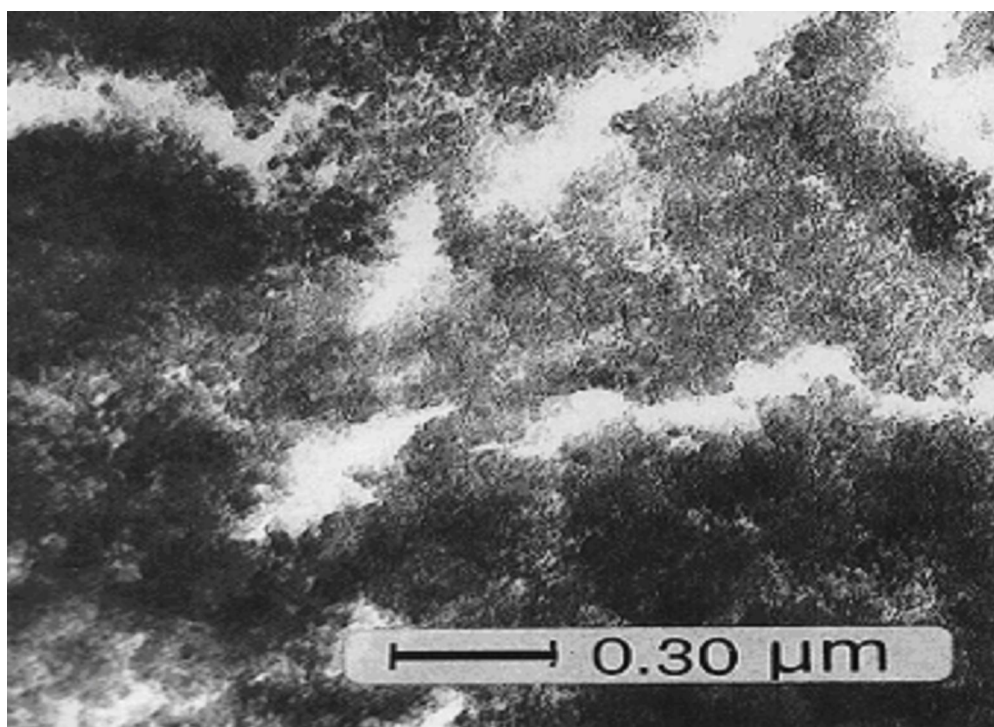


Figura 4.6 Micrografia a trasmissione dell'ossido di alluminio amorfo

4.1.3. Area superficiale

I campioni studiati hanno mostrato un' elevata area superficiale: 135 m²/g per l'ossido di alluminio a scarso ordine cristallino e 230 m²/g per la ferridrite (Tabella 4.1).

Tabella 4.1. Area superficiale e punto di carica zero (PCZ) degli ossidi

Minerali	Area superficiale (m ² /g)	Punto di carica zero (pcz)
Ferridrite	230	8.6
Al(OH) _x	135	9.5

4.1.4. Adsorbimento di As(III) e As(V)

Sugli ossidi di Fe e Al sono state determinate le isoterme di adsorbimento di As(III) e As(V) a pH 6.0 e 20°C (Figure 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10).

Concentrazioni crescenti di ioni As(III) e As(V) sono state aggiunte ai campioni (100 mg) e le sospensioni (in KCl 0.01 M per mantenere costante la forza ionica) sono state mantenute in agitazione per 24 ore a pH costante mediante aggiunta di NaOH o HCl 0.01M. Le quantità di As(III) e As(V) adsorbite sono state diagrammate utilizzando l'equazione di Langmuir:

$$S = \frac{Sm \times K \times C}{1 + K \times C}$$

Dove:

S = quantità di As adsorbita in mmoli/kg

S_m = quantità massima di As che può essere adsorbita sul materiale

C = concentrazione di As nella soluzione all'equilibrio (mmoli/L)

K = costante che permette di valutare l'energia con cui l'As è adsorbito sul materiale adsorbente.

L'adsorbimento può essere descritto da quattro tipi di isoterme (S, L, H, C) come riportato nella Figura 4.6. Nell'isoterma di tipo S la pendenza della curva inizialmente cresce all'aumentare della concentrazione dell'adsorbito, ma poi tende a diminuire, fino a diventare zero, quando i siti vuoti di adsorbimento vengono riempiti. Questo tipo di isoterma indica che a basse concentrazioni la superficie ha una bassa affinità per il materiale adsorbito, che tende ad aumentare a concentrazioni più alte di materiale. L'isoterma di tipo L (Langmuir) è caratterizzata da una pendenza decrescente all'aumentare della concentrazione del materiale adsorbito poiché i siti vuoti adsorbenti tendono a diminuire. Questo comportamento può essere spiegato dall'alta affinità dell'adsorbente per l'adsorbito a basse concentrazioni, che poi decresce quando la concentrazione dell'adsorbito aumenta. Il tipo H (high-affinity) è indicativo di una forte interazione adsorbito-adsorbente, come ad esempio quando vengono a formarsi complessi di superficie particolarmente forti "inner-sphere complexes". Le isoterme di tipo C, invece, sono indicative di una ripartizione di ioni o molecole tra fase solida (adsorbimento) e soluzione, senza che si instauri tra adsorbente ed adsorbito nessun legame specifico.

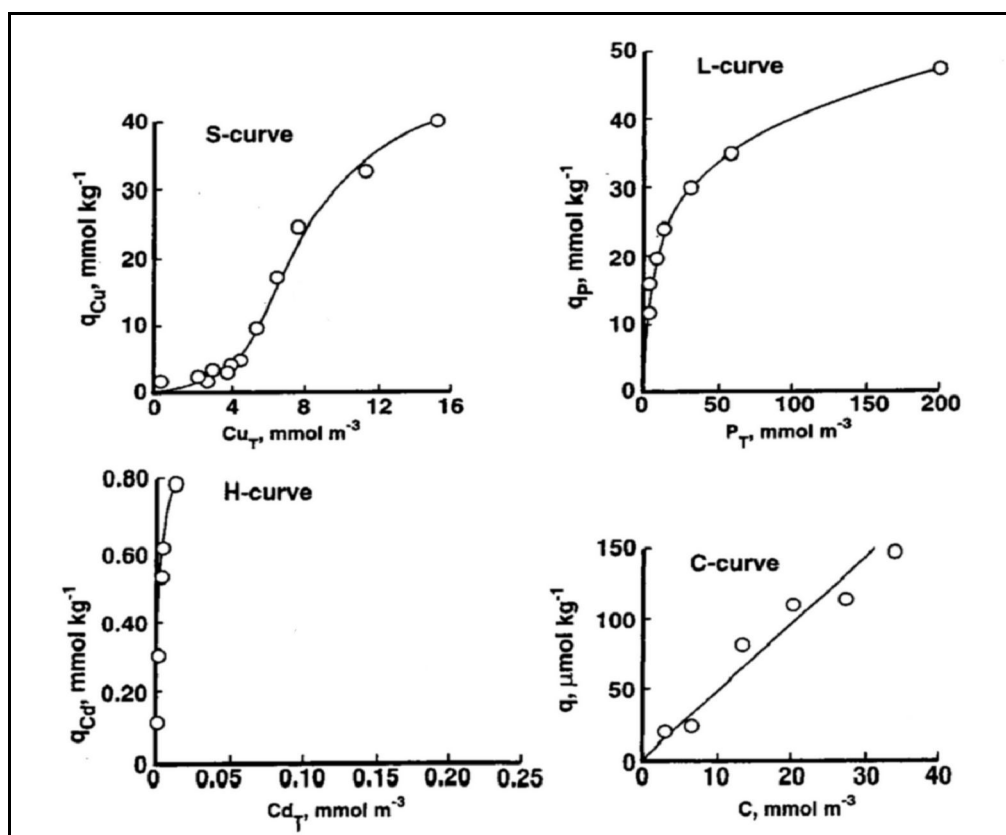


Figura 4.6. : Isoterma di adsorbimento di tipo S, L, H, e C.

Le isoterme di adsorbimento dell'arsenito (AsIII) sull'ossido di alluminio a scarso ordine cristallino e sulla ferridrite sono risultate essere rispettivamente di tipo L e di tipo H (Figura 4.7 e 4.8). Questi risultati confermano quanto dimostrato recentemente da Violante e Pigna (2002). che Tali autori hanno infatti evidenziato una più alta affinità dell'arsenito per gli ossidi di ferro, manganese e titanio rispetto agli ossidi di alluminio.

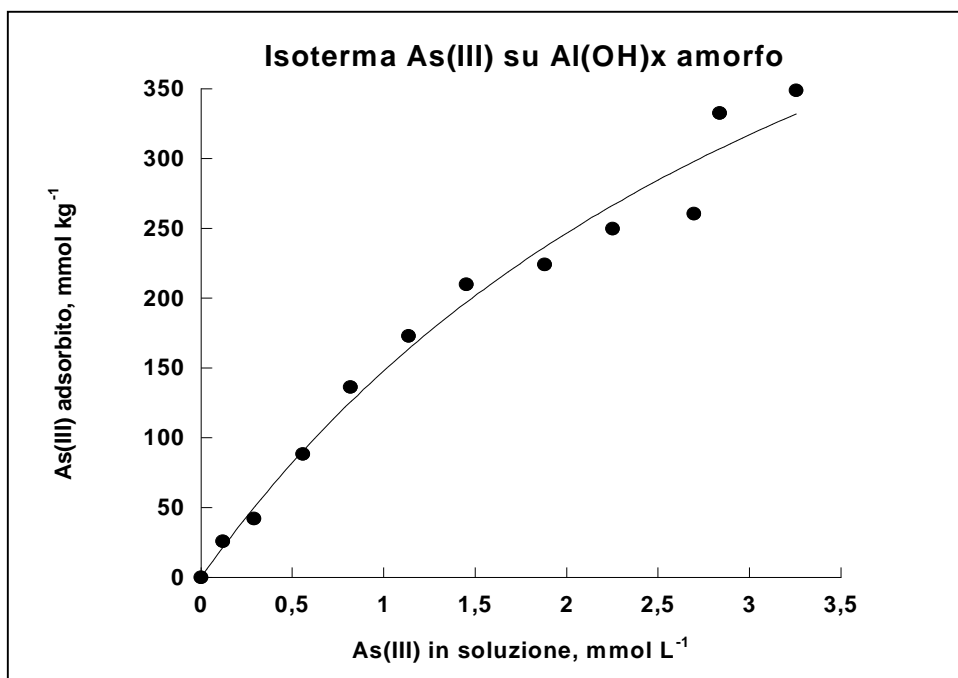


Figura 4.7.: Isoterma di adsorbimento di arsenito sull'ossido di alluminio amorfo

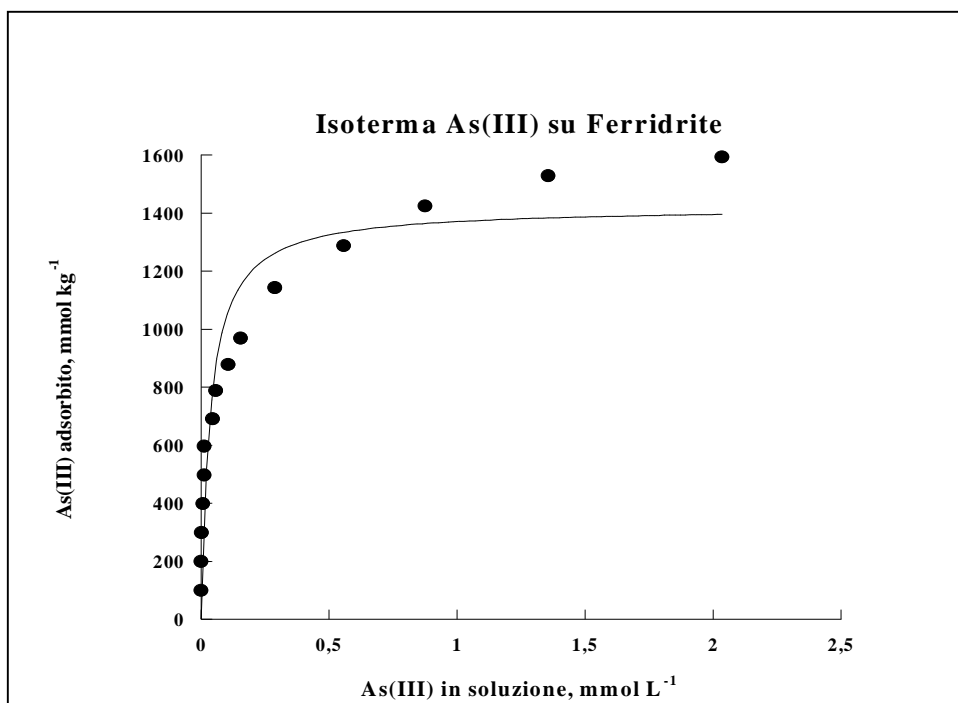


Figura 4.8.: Isoterma di adsorbimento di arsenito sulla ferridrite

Le isoterme di adsorbimento dell'arseniato (AsV) sull'ossido di alluminio a scarso ordine cristallino e sulla ferridrite sono risultate essere di tipo H (Figure 4.9 e 4.10).

Da queste isoterme si può evincere come la ferridrite sia un adsorbente con elevata capacità di fissare l'arseniato. Infatti, mentre l'ossido di alluminio amorfo riesce ad adsorbire una quantità pari a circa 300 mmoli kg^{-1} di As(V) , la ferridrite ha una capacità d'adsorbimento notevolmente più alta, adsorbendo circa 600 mmoli kg^{-1} di As(V) . Questo può essere spiegato in parte tenendo conto del più elevato valore di area superficiale della ferridrite rispetto all'ossido di alluminio, ma anche alla forte affinità tra gli ossidi di ferro e lo ione As(V) (Violante and Pigna, 2002).

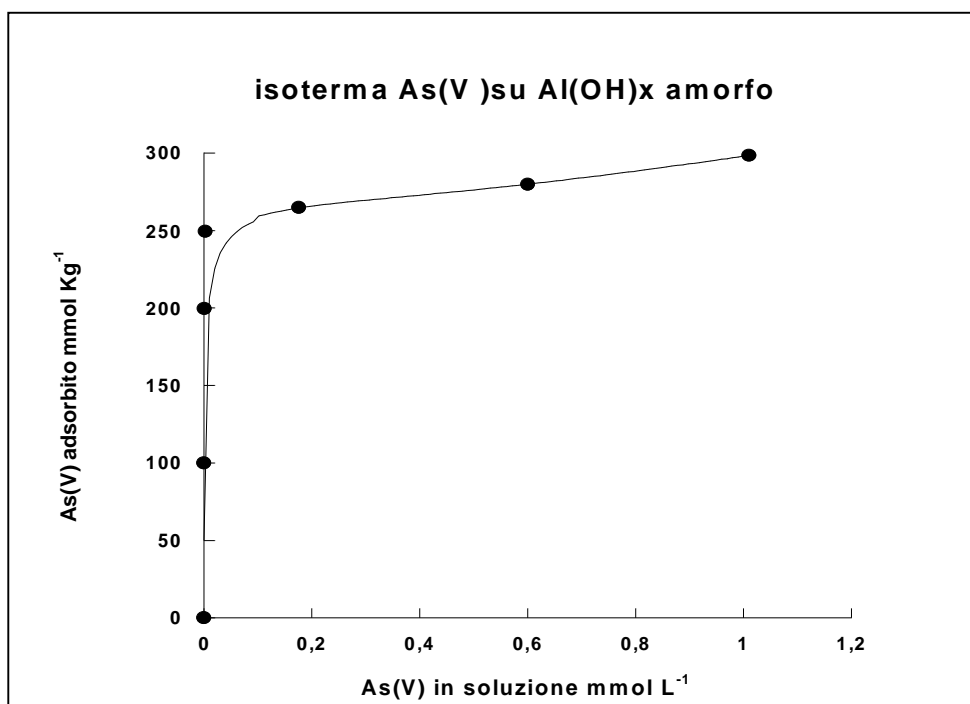


Figura 4.9.: Isotherma di adsorbimento di arseniato sull'ossido di alluminio amorfo

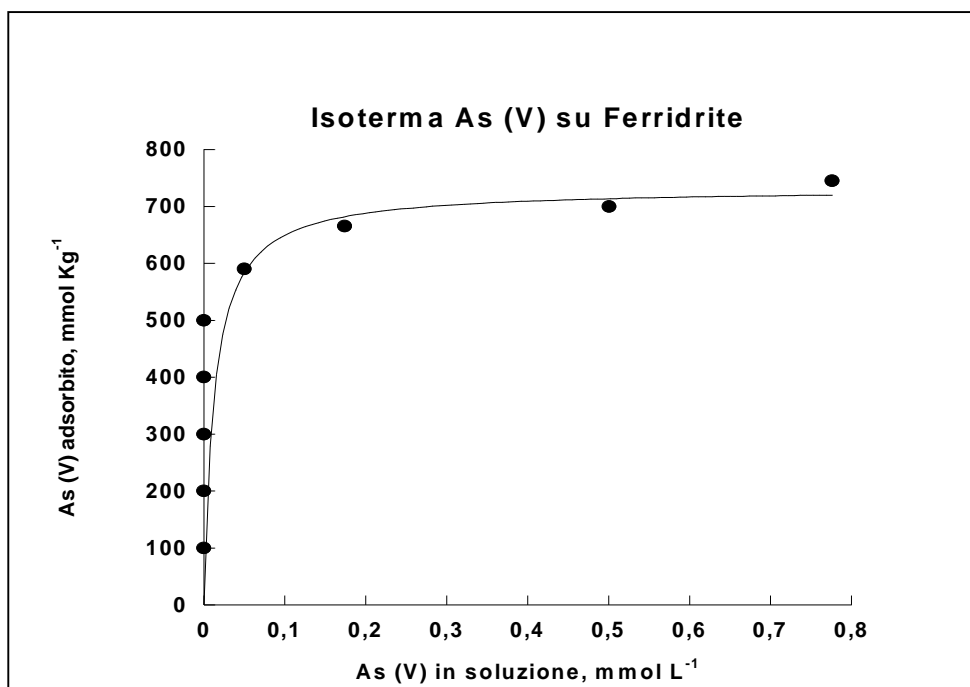


Figura 4.10.: Isotherma di adsorbimento di arseniato sulla ferridrite

4.1.5. Adsorbimento competitivo di ioni As(III) e leganti inorganici e organici sulla ferridrite e sull'ossido di alluminio amorfo

Nelle Tabelle 4.2 e 4.3 sono riportate rispettivamente le quantità di arsenito adsorbite a pH 6.0 sulla ferridrite e sull'ossido di alluminio amorfo in presenza di anioni inorganici (solfato, seleniato, selenito e fosfato) e organici (ossalato, malato, tartrato e citrato) aggiunti contemporaneamente a rapporto molare iniziale legante/As(III) = 1 e 2. La competizione tra l'arsenito e i differenti leganti è stata valutata dopo 24 ore dalla loro aggiunta.

Il parametro utilizzato per confrontare il comportamento dei vari anioni nel competere con gli anioni As(III) è l'efficienza.

$$Efficienza = \frac{As - (As + legante)}{As} \times 100$$

Dove:

As = quantità di arsenico adsorbita in assenza di legante

As + legante = quantità di arsenico adsorbita in presenza di legante

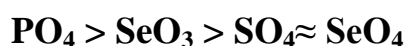
Un primo aspetto molto importante che emerge da questo studio è che l'efficienza degli anioni, sia inorganici che organici, nell'inibire l'adsorbimento degli ioni arsenito è più elevata sull'ossido di alluminio che sulla ferridrite (Tabelle 4.2 e 4.3).

Questo diverso comportamento è da attribuire alla diversa forza di

legame con cui gli ioni arsenito si vanno ad adsorbire sulle superfici degli adsorbenti. E' noto infatti, che gli ioni arsenito formano "inner-sphere complexes" ovvero legami chimici molto forti su ossidi di Fe, Mn e Ti e su componenti del suolo ricchi di tali elementi, mentre su ossidi di alluminio, sugli alluminosilicati e su suoli ricchi di alluminio formano in prevalenza "outer-sphere complexes" ossia legami chimici di natura elettrostatica molto più deboli e instabili. L'adsorbimento dell'arsenito inoltre diminuisce notevolmente quando la quantità di legante aggiunta è doppia.

Per quanto concerne la competizione dei singoli anioni inorganici nei confronti dell'arsenito è stato osservato che il fosfato è l'anione che ha la più elevata efficienza di inibizione rispetto agli altri anioni sia sulla ferridrite che sull'ossido di alluminio. Sull'ossido di alluminio il fosfato riesce ad inibire l'adsorbimento di arsenito dell'80,4 % a rapporto $\text{PO}_4/\text{As(III)} = 1$ e dell' 87,9 % a rapporto $\text{PO}_4/\text{As(III)} = 2$. Al contrario il solfato ed il seleniato sono gli anioni che in assoluto inibiscono l'adsorbimento dell'arsenito in misura minore rispetto agli altri anioni (organici ed inorganici).

anioni inorganici su entrambi gli ossidi:



Per quanto riguarda la competizione tra arsenito e anioni organici si sono avuti risultati differenti a seconda dell'ossido utilizzato. In generale il citrato è risultato essere l'anione con la più alta efficienza nell'inibire l'adsorbimento di ioni As(III) sia sull'ossido di alluminio che sulla ferridrite. Inoltre, sempre sulla ferridrite, a rapporto molare iniziale leganti/As(III) = 1 l'ossalato è stato l'anione meno efficiente, mentre a rapporto molare iniziale Leganti/As(III) = 2 l'ossalato diviene il secondo anione organico competitore dopo il citrato.

Tabella 4.2. Adsorbimento competitivo As(III)-leganti su ferridrite a pH 6.0 e a rapporto molare iniziale legante/As(III) = 1 e 2. As(III) aggiunto 1000 mmoli kg⁻¹.

Leganti	As(III) adsorbito (legante/As 1) mmol kg⁻¹	As(III) adsorbito (legante/As 2) mmol kg⁻¹	Efficienza (legante/As 1) %	Efficienza (legante/As 2) %
SO ₄	954,4	954,4	1,5	1,5
SeO ₄	948,2	932,7	2,2	3,8
SeO ₃	753,1	654,2	22,3	32,5
PO ₄	501	297,5	48,3	69,3
Ox	893,4	856,1	7,8	11,7
Mal	839	770,2	13,4	20,5
Tar	837,4	763,9	13,6	21,2
Cit	778,4	712,2	19,7	26,5
Arsenito solo	969,1	969,1	-	-

Tabella 4.3. Adsorbimento competitivo As(III)-leganti su Al(OH)₃ a pH 6.0 e a rapporto molare iniziale legante/As(III) = 1 e 2. As(III) aggiunto 200 mmoli kg⁻¹.

Leganti	As(III) adsorbito (legante/As 1) mmol kg⁻¹	As(III) adsorbito (legante/As 2) mmol kg⁻¹	Efficienza (legante/As 1) %	Efficienza (legante/As 2) %
SO ₄	68.0 ± 1.8	51.9 ± 1.6	17.8	37.3
SeO ₄	67.2 ± 2.0	62.0 ± 2.0	18.8	25.1
SeO ₃	57.5 ± 1.6	37.3 ± 1.4	30.5	54.9
PO ₄	16.2 ± 0.1	10.0 ± 0.1	80.4	87.9
Ox	50.7 ± 1.3	38.8 ± 1.8	38.8	53.1
Mal	40.7 ± 1.2	39.0 ± 1.2	50.8	52.9
Tar	46.7 ± 0.9	42.5 ± 0.6	43.6	48.7
Cit	38.8 ± 0.7	34.6 ± 3.2	53.1	58.2
Arsenito solo	82.8 ± 2.6	82.8 ± 2.6	-	-

In generale si può riportare il seguente schema di efficienza degli

In generale si può riportare il seguente schema che rappresenta l'ordine di efficienza per gli anioni organici:

Cit > Mal > Tar > Ox su Al(OH)_x a rapporto molare iniziale leganti/As(III) =1

Cit > Ox \approx Mal > Tar su Al(OH)_x a rapporto molare iniziale leganti/As(III) =2

Cit > Tar > Mal > Ox sulla ferridrite a rapporto molare iniziale leganti/As(III) =1

Cit > Tar > Mal > Ox sulla ferridrite a rapporto molare iniziale leganti/As(III) =2

4.1.6. Adsorbimento competitivo di ioni As(V) e leganti inorganici e organici sulla ferridrite e sull'ossido di alluminio amorfo

Nelle Tabelle 4.4 e 4.5 sono riportate rispettivamente le quantità di arseniato adsorbite a pH 6.0 sulla ferridrite e sull'ossido di alluminio amorfo in presenza di anioni inorganici (solfato, seleniato, selenito e fosfato) e organici (ossalato, malato, tartrato e citrato) aggiunti contemporaneamente a rapporto molare iniziale legante/As(V) = 1 e 2. La competizione tra l'arseniato e i differenti leganti è stata valutata dopo 24 ore dalla loro aggiunta.

La prima considerazione da fare è che sia gli anioni inorganici che quelli organici inibiscono l'adsorbimento dell'arseniato maggiormente sull'ossido di alluminio che sulla ferridrite. Il fosfato, come già visto anche per l'arsenito, è l'anione che in assoluto ha la maggiore efficienza di inibizione sull'adsorbimento dell'arseniato su entrambi gli ossidi studiati. Al contrario il solfato ed il seleniato riescono ad influenzare l'adsorbimento dell'arseniato solo sull'ossido di alluminio quando sono aggiunti in quantità doppie rispetto all'arseniato stesso.

Si può quindi riportare il seguente schema che rappresenta l'ordine di efficienza per gli anioni inorganici su entrambi gli ossidi :

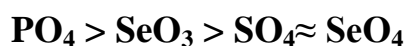


Tabella 4.4. Adsorbimento competitivo As(V)-leganti su Al(OH)_x a pH 6.0 e a rapporto molare iniziale legante/As(V) = 1 e 2. As(V) aggiunto 250 mmoli kg⁻¹.

Leganti	As(V) adsorbito (legante/As 1) mmol kg ⁻¹	As(V) adsorbito (legante/As 2) mmol kg ⁻¹	Efficienza (legante/As 1) %	Efficienza (legante/As 2) %
SO ₄	244.1 ± 3.5	226.9 ± 4.9	2.2	9.1
SeO ₄	243.9 ± 4.1	227.4 ± 4.7	2.2	8.8
SeO ₃	172.5 ± 3.1	168.5 ± 4.5	30.9	32.5
PO ₄	147.2 ± 3.0	115.2 ± 2.7	41.0	53.8
Ox	231.8 ± 4.8	172.7 ± 3.1	7.1	30.8
Mal	166.2 ± 4.5	145.6 ± 2.6	33.4	41.6
Tar	197.0 ± 3.5	168.0 ± 2.8	21.0	32.7
Cit	170.1 ± 2.9	156.1 ± 2.4	31.8	37.4
Arsenito solo	249.5 ± 3.7	249.5 ± 3.7	-	-

Tabella 4.5. Adsorbimento competitivo As(V)-leganti su ferridrite a pH 6.0 e a rapporto molare iniziale legante/As(V) = 1 e 2. As(V) aggiunto 600 mmoli kg⁻¹.

Leganti	As(V) adsorbito (legante/As 1) mmol kg ⁻¹	As(V) adsorbito (legante/As 2) mmol kg ⁻¹	Efficienza (legante/As 1) %	Efficienza (legante/As 2) %
SO ₄	580,2	578,8	1,3	1,5
SeO ₄	580,8	574,6	1,2	2,2
SeO ₃	485,2	467,5	17,4	20,5
PO ₄	344,8	249,3	41,3	57,6
Ox	551	541,7	6,2	7,8
Mal	515,7	501,9	12,3	14,6
Tar	509,1	499	13,4	15,1
Cit	507,2	488,7	13,7	16,8
Arsenito solo	587,7	587,7	-	-

Gli anioni organici influenzano moderatamente l'adsorbimento dell'arseniato sulla ferridrite sia a rapporto molare 1/1 che 2/1. In particolare, il citrato, che è il maggiore competitore, riesce ad inibire l'adsorbimento dell'arseniato al massimo del 17 % a rapporto Leganti/As = 2.

Questo comportamento è dovuto al fatto che l'arseniato a differenza dell'arsenito forma legami chimici di tipo "inner-sphere" su entrambi gli ossidi.

In generale si può riportare il seguente schema che rappresenta l'ordine di efficienza per gli anioni organici:

Mal \approx Cit > Tar > Ox su Al(OH)_x a rapporto molare iniziale leganti/As(V) =1

Mal \approx Cit > Tar \approx Ox su Al(OH)_x a rapporto molare iniziale leganti/As(V) =2

Cit \approx Tar \approx Mal > Ox sulla ferridrite a rapporto molare iniziale leganti/As(V) =1

Cit > Tar \approx Mal > Ox sulla ferridrite a rapporto molare iniziale leganti/As(V) =2

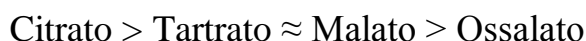
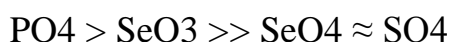
4.1.7. CONCLUSIONI

In generale l'efficienza dei diversi anioni organici ed inorganici nel competere con gli ioni As(III) e As(V) è maggiore sull'ossido di alluminio che sull'ossido di Fe

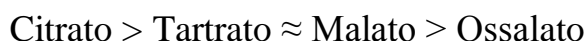
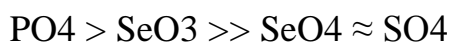
In questo lavoro di tesi è stato evidenziato come la mobilità dell'arsenico sia influenzata da diversi fattori, come: i) la natura e le proprietà dell'adsorbente, ii) i differenti anioni organici ed inorganici presenti.

In particolare è stato accertato che:

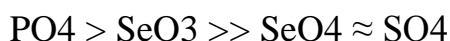
a) l'efficienza dei diversi anioni inorganici ed organici nel competere con gli ioni As(III) sulla ferridrite è la seguente:



b) l'efficienza dei diversi anioni inorganici ed organici nel competere con gli ioni As(V) sulla ferridrite è la seguente:



c) l'efficienza dei diversi anioni inorganici ed organici nel competere con gli ioni As(III) sull'ossido di alluminio è la seguente:



Citrato \approx Malato $>$ Tartrato $>$ Ossalato

d)l'efficienza dei diversi anioni inorganici ed organici nel competere con gli ioni As(V) sull' ossido di alluminio è la seguente:

$\text{PO}_4 > \text{SeO}_3 \gg \text{SeO}_4 \approx \text{SO}_4$

Citrato \approx Malato $>$ Tartrato $>$ Ossalato

4.2 PROVA SPERIMENTALE SU CICHORUM ENDIVIA

4.2.1 Caratteristiche chimico fisiche del suolo campionato

Il suolo utilizzato per la prova sperimentale su *Cichorium endivia* (scarola) è un suolo calcareo moderatamente alcalino con tessitura franco argillosa, mediamente fornito di carbonio ed azoto (Tabella 1).

Tabella 1: Caratteristiche chimico-fisiche del suolo di Scarlino (Gr) – località Casone	
pH (1:2,5 M/V)	8,2
EC (ms cm ⁻¹)	460
Tessitura	Franco argilloso
<i>sabbia</i> (g Kg ⁻¹)	316
<i>Limo</i> (g Kg ⁻¹)	327
<i>argilla</i> (g Kg ⁻¹)	357
Carbonio totale (g Kg ⁻¹)	8.9
Azoto totale (g Kg ⁻¹)	1.3
Calcare totale (g Kg ⁻¹)	45.1
Basi Scambiabili	
<i>K⁺</i> (cmol(+) Kg ⁻¹)	0.44
<i>Na⁺</i> (cmol(+) Kg ⁻¹)	0.61
<i>Mg²⁺</i> (cmol(+) Kg ⁻¹)	12.5
<i>Ca²⁺</i> (cmol(+) Kg ⁻¹)	13.1
C.S.C.	28
Fosforo totale (mg Kg ⁻¹)	440
Fosforo disponibile (mg Kg ⁻¹)	5
Arsenico totale (mg Kg ⁻¹)	297
Arsenico disponibile (mg Kg ⁻¹)	5

La dotazione di fosforo disponibile (5 mg kg^{-1}) è risultata molto bassa e insufficiente per soddisfare le esigenze delle colture. La concentrazione di arsenico nel suolo oggetto di studio è di 300 mg kg^{-1} , valore decisamente al di sopra dei limiti di legge consentiti (20 mg kg^{-1} – DM 471, 1999).

4.2.2 Produzione di biomassa

In Tabella 2 sono riportati i dati relativi alla produzione di biomassa della pianta. Il peso secco delle foglie e delle radici è risultato statisticamente più elevato nelle piante inoculate e concimate con fosforo (AM+ P+). Quando entrambi i fattori sono stati combinati la produzione è incrementata del 35% rispetto alle piante concimate e non inoculate (AM- P+) (Tabella 2, Figura 1). Anche laddove non è stata effettuata concimazione, l'inoculazione ha prodotto una biomassa lievemente maggiore. Le piante concimate con fosforo (AM+ P+ e AM- P+) hanno evidenziato un incremento di biomassa del 67% e del 62% in confronto alle piante nei trattamenti AM+ P- e AM- P- rispettivamente (Tabella 2 e Figura 1). I risultati hanno mostrato, in assenza di fosforo, una ridotta crescita delle piante. I benefici dell'inoculazione sulla biomassa prodotta si sono rivelati maggiormente evidenti con l'aggiunta di fosforo. I risultati ottenuti, indicano che la scarola risulta molto sensibile alle elevate concentrazioni di As presenti nel suolo oggetto di studio, con effetti fitotossici evidenziati dalla notevole riduzione della crescita, soprattutto in assenza di concimazione fosfatica. L'arseniato agisce come analogo chimico del fosfato ed è trasportato attraverso il sistema di cotrasporto per il fosfato presente sulla membrana plasmatica delle cellule radicali (Ullrich-Erebius et al., 1989). All'interno del citoplasma, l'arseniato compete con il fosfato, ad es. sostituendolo nella formazione dell'ATP e dando luogo alla formazione di un instabile complesso ADP-As, da cui consegue il collasso del metabolismo

energetico della cellula (Meharg, 1994). Nelle piante non resistenti si può aumentare la tolleranza all'arsenico, favorendo un maggiore assorbimento di fosforo, e quindi incrementando la concentrazione di fosfato a livello citoplasmatico, da cui ne risulta una più efficace competizione per i processi biochimici in cui l'arseniato si sostituisce al fosfato, che limiterebbe gli effetti distruttivi dell'arseniato all'interno della cellula (Meharg, 1994). Tuttavia, le piante rispondono debolmente all'aggiunta di fosforo in assenza di inoculazione, mostrando che vi sono dei benefici limitati dalla sola concimazione e solo quando entrambi i fattori sono combinati le piante raggiungono delle dimensioni vicine agli standard commerciali.

Tabella 2 : Sostanza Secca prodotta (g) di <i>Cichorium endivia</i>			
Tesi	Foglie	Radici	Totale
AM+ P+	6,94 ± 0,55	0,92 ± 0,10	7,86
AM- P+	4,48 ± 0,56	0,61 ± 0,37	5,09
AM+ P-	2,24 ± 0,21	0,36 ± 0,23	2,60
AM- P-	1,68 ± 0,19	0,23 ± 0,09	1,91

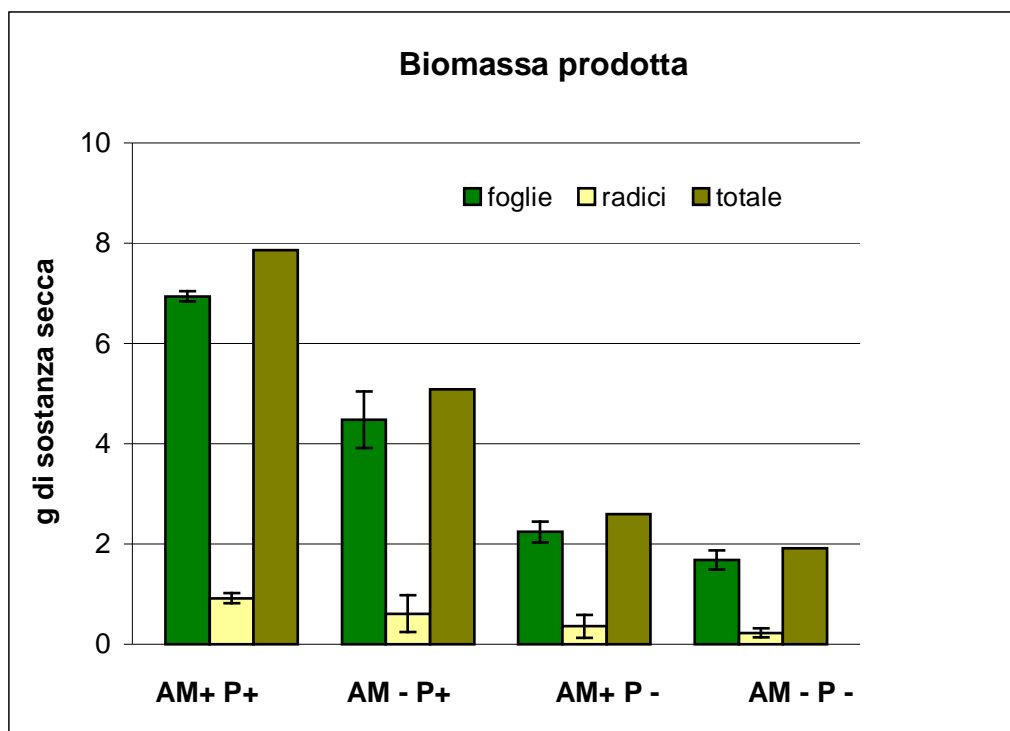


Fig.1: Biomassa fogliare, radicale e totale prodotta dalle piante di *Cichorium endivia*

L'inoculazione con funghi micorrizici probabilmente limita l'effetto fitotossico dell'arsenico, migliorando la nutrizione fosfatica della pianta, laddove il nutriente è stato aggiunto con la concimazione. Infatti, uno dei ruoli principali delle micorrize è assorbire più nutrienti, ed in particolare il fosforo, per la pianta ospite (Smith e Read, 1997; Marschner e Dell, 1994) consentendo un migliore sviluppo della pianta stessa. I risultati mettono in luce l'importanza che l'inoculazione con i funghi micorrizici arbuscolari, congiuntamente alla concimazione fosfatica, possono rivestire nel conferire alla pianta una maggiore tolleranza a concentrazioni elevate di arsenico nel suolo.

4.2.3 Concentrazione e contenuto di As negli organi vegetali

La concentrazione di arsenico negli organi della scarola, soprattutto in quelli epigei, è risultata piuttosto bassa in tutte le tesi. Peijnenburg et al. (2000) hanno osservato che l'assorbimento di metalli pesanti in *Lactuca*

sativa, appartenente alla stessa famiglia della scarola (*Composite*) dipende dal tipo di metallo ed è poco rilevante per l'arsenico. In Tabella 3 sono riportati i valori della concentrazione di As nelle radici e nelle foglie. In tutte le tesi si nota un accumulo del metalloide negli apparati ipogei. Tuttavia non sono state osservate differenze significative fra i vari trattamenti.

Per quanto riguarda la parte epigea, la concentrazione di As più elevata è stata osservata nelle piante AM+P- ($1,83 \mu\text{g g}^{-1}$). Quindi, la presenza dell'inoculo commerciale, in assenza di concimazione fosfatica, ha determinato una maggiore concentrazione del metalloide negli organi epigei. Diversi autori hanno studiato l'influenza dei funghi micorrizici sull'assorbimento di arsenico nelle piante ottenendo in alcuni casi, risultati contrastanti. Infatti Liu et al. (2005), hanno osservato nelle radici di piante di pomodoro inoculate o non inoculate cresciute su un terreno al quale è stato aggiunto una quantità di arsenico pari a 150 mg kg^{-1} , una concentrazione di arsenico pari a 1500 mg kg^{-1} . Chen et al. (2007), studiando l'influenza dei funghi AM sull'assorbimento di P e As in piante di erba medica (*Medicago sativa*), hanno osservato che la colonizzazione da parte dei funghi simbiotici riduce la concentrazione di As sia negli organi epigei della pianta che in quelli ipogei. D'altra parte, Galli et al. (1995) non hanno riscontrato alcun effetto in presenza di funghi simbiotici sulla concentrazione di metalli nei tessuti vegetali.

La concentrazione di arsenico nelle foglie e nelle radici è risultata più elevata con l'inoculazione, in assenza di concimazione fosfatica, ma diminuisce con l'inoculazione e la concimazione (Tabella 3).

I risultati hanno evidenziato, nelle foglie delle piante concimate, un contenuto di arsenico significativamente maggiore rispetto alle piante non

concimate, e più elevato nelle piante inoculate rispetto alle non inoculate (Tabella 3), in conseguenza della maggiore biomassa prodotta in questo trattamento. Infatti, l'aumento di biomassa determina una diluizione del metalloide nei tessuti, limitandone l'effetto tossico. Chen et al. (2007) hanno mostrato che il miglioramento della nutrizione fosfatica favorisce la crescita delle piante micorrizzate e determina una considerevole diluizione dell'As sia nelle foglie e sia nelle radici. Altri studi (Liu et al. 2005) hanno evidenziato un effetto favorevole delle micorrize sulle piante ospiti in condizioni di stress ambientale, che potrebbe essere attribuito direttamente o indirettamente al miglioramento della nutrizione fosfatica. Di conseguenza, piante non resistenti all'As possono essere rese più tolleranti al metalloide migliorando la loro nutrizione fosfatica. La riduzione di sensibilità all'arsenico viene determinata da una più elevata concentrazione di P nel citoplasma che, competendo con l'As, ne riduce gli effetti tossici sulle cellule vegetali (Meharg, 2006).

Tab.3: Concentrazione e contenuto di arsenico nei tessuti di <i>Cichorium endivia</i>				
	Concentrazione di As ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Contenuto di As ($\mu\text{g pianta}^{-1}$)	
Tesi	Foglie	radici	foglie	radici
AM+ P+	1,56 \pm 0,05	23,6 \pm 1,0	10.82	21.71
AM - P+	1,79 \pm 0,13	24,2 \pm 3,5	8.01	14.76
AM+ P -	1,83 \pm 0,13	24,9 \pm 1,9	4.1	8.96
AM - P-	1,36 \pm 0,1	23,1 \pm 0,5	2.3	5.30

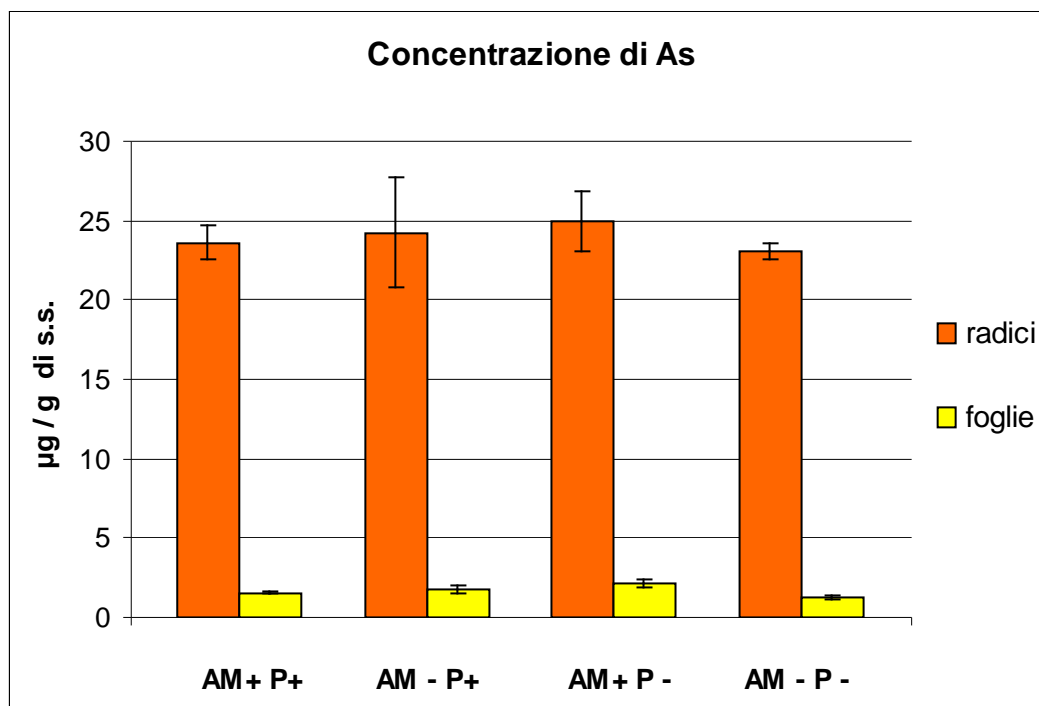


Fig.2: Concentrazione di As nelle foglie e nelle radici di *Cichorium endivia*

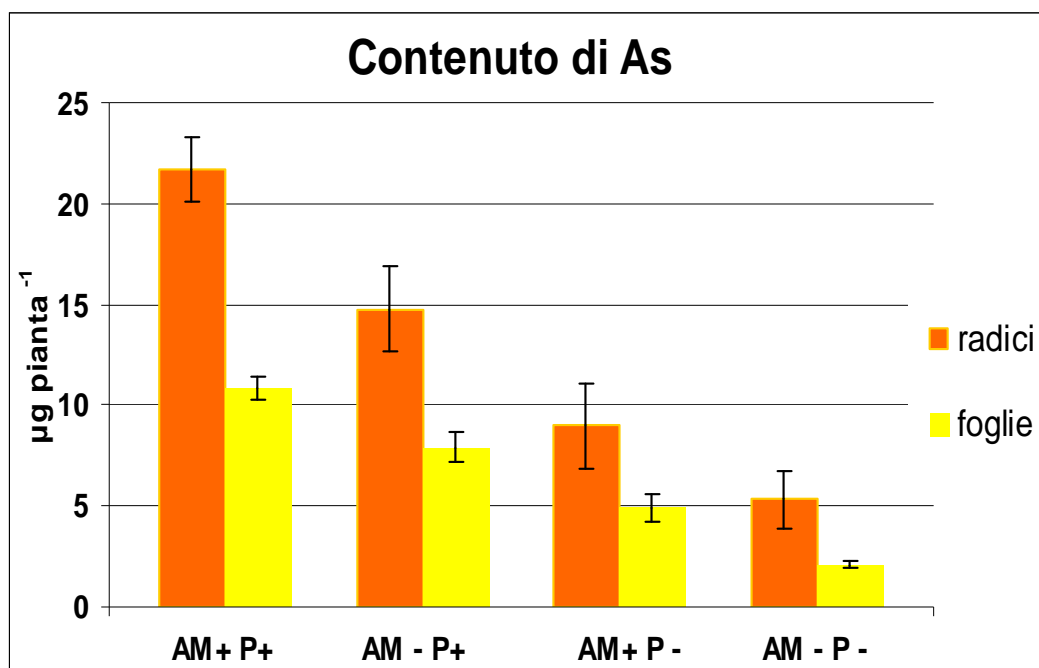


Fig.3 Contenuto di As in foglie e radici di *Cichorium endivia*

4.2.4. Contenuto e concentrazione di P negli organi vegetali

In Tabella 4 e nelle Figura 4-5 sono riportati i dati relativi alle concentrazioni e contenuto di fosforo (P) nelle foglie e nelle radici di *Cichorium endivia* nei quattro trattamenti. Le concentrazioni di P nelle foglie sono risultate significativamente più elevate in presenza di concimazione fosfatica, e tale effetto è stato evidenziato in maggior misura nelle piante inoculate. Infatti, mentre nelle foglie del trattamento AM+P+ è stata rilevata una concentrazione di $3,60 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$, in assenza di inoculazione la concentrazione è risultata significativamente inferiore ($3,06 \text{ mg kg}^{-1} \text{ P}$). Tuttavia, anche in assenza di concimazione fosfatica, l'inoculazione ha favorito un maggiore assorbimento del nutriente rispetto alle piante non inoculate. Nelle radici i valori più elevati sono stati evidenziati nelle piante inoculate e in assenza di concimazione fosfatica.

Il contenuto di P nelle foglie e nelle radici è risultato notevolmente aumentato dall'inoculazione congiuntamente all'applicazione di P (Tabella 4). Tuttavia, in assenza di concimazione, l'inoculazione ha incrementato significativamente il contenuto di P nelle foglie e nelle radici (Tabella 4).

Tuttavia le piante AM- P+ hanno accumulato una quantità doppia del nutriente ($13,8 \text{ mg pianta}^{-1}$) rispetto alle piante AM+ P- ($6,8 \text{ mg pianta}^{-1}$); questo risultato spiega la maggiore produzione di biomassa e l'importanza della concimazione fosfatica sullo stato di salute delle piante, in particolare, in presenza di concentrazioni elevate di As nel suolo. Le piante che non hanno ricevuto alcun trattamento sono quelle che hanno mostrato un contenuto di fosforo più basso in assoluto. In piante di *Lactuca sativa* inoculate con *Glomus intraradices* e concimate con P, Cozzolino et al., 2010b hanno evidenziato un maggiore assorbimento di P per unità di peso di

radice ma un minore assorbimento di As (calcolato dalla somma del contenuto di P o As nelle radici e nelle foglie diviso il peso delle radici). Anche nel presente studio, con la fertilizzazione fosfatica le piante inoculate con *G. intraradices* si sono rivelate più efficienti nell'assorbire il P aggiunto con la concimazione. Infatti con la sola aggiunta di P, la pianta non accede efficientemente al P disponibile nel suolo. Altri ricercatori (Meharg e Macnair, 1992; Lee et al., 2003) hanno dimostrato che piante non resistenti all'As possono essere rese più resistenti aumentando la concentrazione di P nei loro tessuti.

Tab.4: Concentrazione e contenuto di fosforo nei tessuti vegetali di <i>Cichorium indivia</i>				
	Concentrazione di P (mg g⁻¹)		Contenuto di P (mg pianta⁻¹)	
Tesi	foglie	radici	foglie	radici
AM+ P+	3,60 ± 0,15	2,9± 0,16	24,98	2,7
AM - P+	3,06 ± 0,23	2,92 ± 0,26	13,7	1,78
AM+ P-	2,89 ± 0,15	3,17 ± 0,11	6,8	1,14
AM - P-	2,32 ± 0,16	2,60 ± 0,12	3,3	0,60

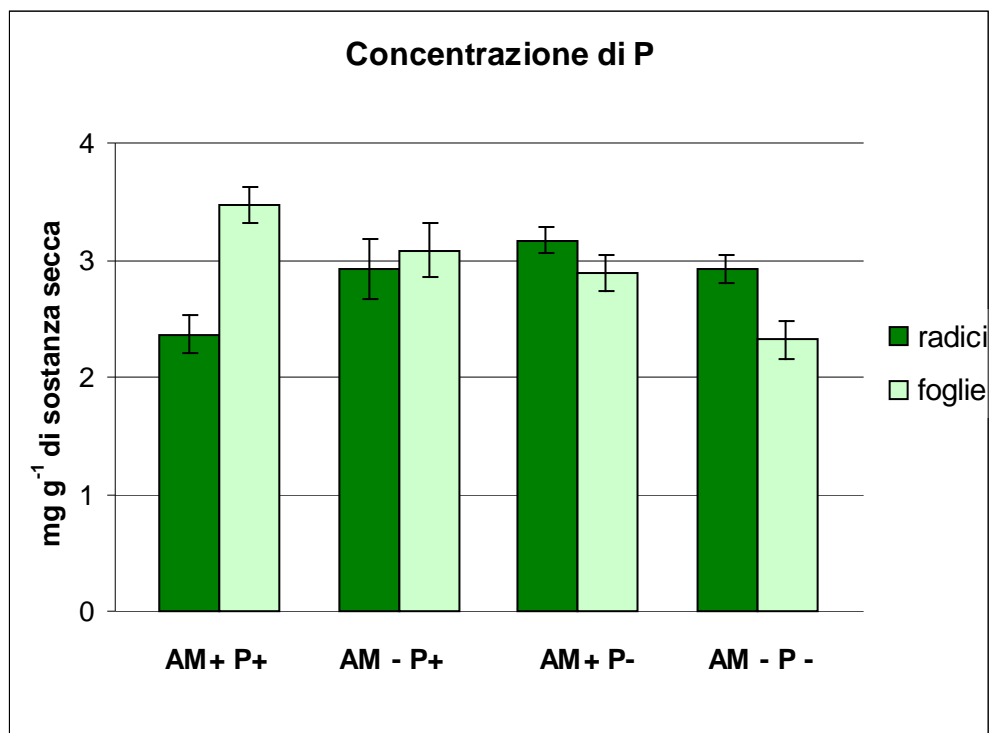


Fig.4 Concentrazione di P in foglie e radici di *Cichorium endivia*

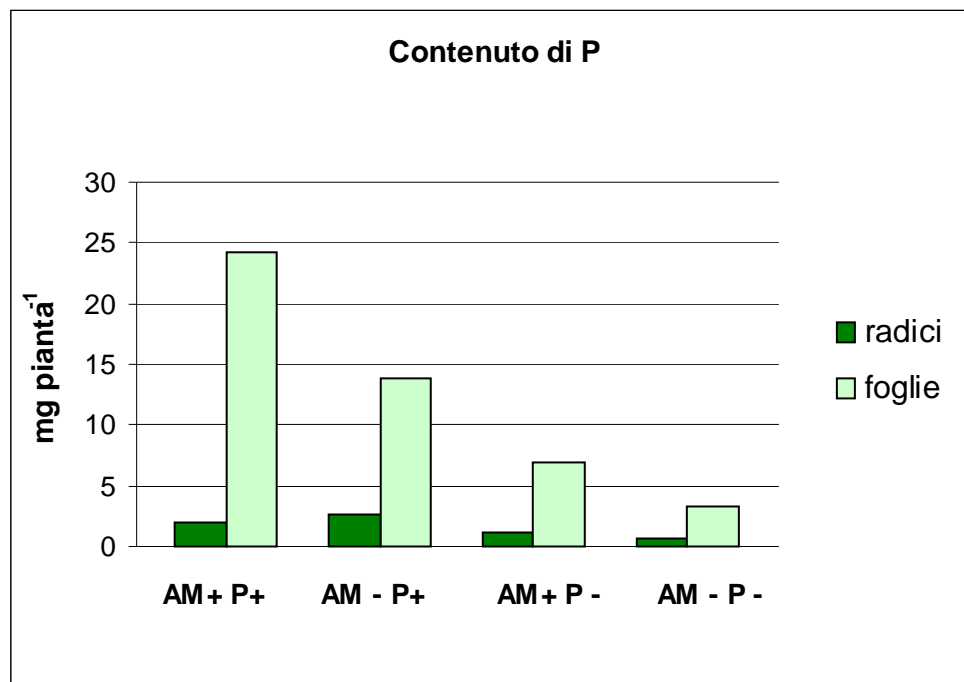


Fig.5 Contenuto di P in foglie e radici di *Cichorium endivia*

4.2.5. Rapporto del contenuto di P e di As negli organi vegetali

I rapporti del contenuto di fosforo e di arsenico nelle foglie e le radici (foglie/radici As e P) e dei rapporti P/As nei due organi, consentono di valutare la capacità traslocativa di entrambi gli elementi dalle radici alle foglie. I dati relativi ai suddetti rapporti sono presentati nella Tabella 5. I risultati hanno evidenziato una minore traslocazione dell'As nella parte epigea nelle piante inoculate rispetto alle non inoculate, nelle piante concimate con P. Non sono state evidenziate differenze significative, in assenza di concimazione tra le piante inoculate e non inoculate. Al contrario, l'inoculazione, in presenza e assenza di P, favorisce una maggiore traslocazione del nutriente dalle radici alla parte aerea, come è indicato dai valori significativamente più elevati, in confronto alle rispettive tesi non inoculate. La migliore nutrizione fosfatica nelle piante inoculate e concimate riduce la traslocazione dell'As negli organi epigei. Tali osservazioni confermano i risultati di Meharg et al., (1994), i quali trovarono che il P riduce il trasferimento dell'As dal suolo alla parte aerea della pianta. Per alleviare la tossicità da As, la pianta deve assorbire delle quantità sufficienti di P tali da bilanciare l'eccesso di As (Burlò et al., 1999; Carbonell-Barrachina et al., 1997).

I valori dei rapporti P/As nelle foglie sono risultati notevolmente più elevati che nelle radici (Tabella 5). Inoltre, l'inoculazione congiuntamente alla concimazione hanno notevolmente incrementato i rapporti P/As principalmente nelle foglie. Il miglioramento della nutrizione fosfatica e della crescita nelle piante inoculate e concimate, ha considerevolmente diluito l'As, in particolare nelle foglie. Questa diluizione conduce ai rapporti P/As decisamente più elevati, in particolare nelle foglie.

Tab. 5: Rapporto As foglie/As radici; P foglie/ P radici; P / As in foglie e radici di <i>Cichorium indivia</i>								
	foglie/radici				P/As			
tesi	As		P		foglie		radici	
AM+ P+	0,49	b	9.25	a	2308	A	124	ab
AM - P+	0,55	a	7,69	b	1710	B	121	c
AM+ P -	0,45	c	5,96	c	1658	C	127	a
AM - P -	0,43	c	5,50	cd	1434	D	113	d

4.2.6. CONCLUSIONI

Le micorrize costituiscono una parte integrale e funzionale delle radici, provvedendo a creare un legame diretto tra suolo e apparato radicale. Tale associazione simbiotica può rivestire una grande importanza nel determinare la disponibilità e la tossicità di elementi tossici per le piante (Leyval et al., 1997). Molti studi hanno mostrato che piante che si sono adattate a crescere in suoli contaminati da As, generalmente formano associazioni simbiotiche con le micorrize (Meharg e Hartlet-Whitaker, 2002; Sharples et al., 2002a, b). La colonizzazione dei funghi micorrizici determina una maggiore resistenza delle piante all'As (Meharg e Hartlet-Whitaker, 2002). Nel presente studio, in un suolo contaminato da As, la sola concimazione fosfatica non ha permesso di ottenere un prodotto commerciabile, per la scarola. L'utilizzo di un efficace inoculo fungino con la concimazione fosfatica, ha permesso di ottenere delle piante perfettamente commerciabili. Tuttavia, gli effetti benefici dei funghi simbiotici utilizzati sono stati osservati solo in presenza di concimazione fosfatica. A tal proposito, è necessario considerare che il suolo utilizzato per la sperimentazione è estremamente povero di P disponibile. Il nutriente potrebbe essere presente nel suolo, in concentrazioni non sufficienti, tali da non permettere un approvvigionamento, da parte del sistema micorriza-pianta, adeguato per diluire la concentrazione di As nei tessuti e quindi ridurre la fitotossicità.

Questo studio ha fornito delle indicazioni ulteriori sul ruolo protettivo dell'inoculazione con funghi micorrizici arbuscolari sulla pianta ospite in suoli contaminati da As. In presenza di concimazione fosfatica, l'inoculazione ha stimolato una maggiore crescita, migliorando la nutrizione fosfatica, riducendo l'assorbimento di As, producendo così un effetto diluizione sul contenuto di As nei tessuti della pianta. Tali risultati possono

essere di una certa importanza, evidenziando il potenziale ruolo che l'inoculazione con funghi micorrizici arbuscolari congiuntamente alla concimazione fosfatica possono rivestire nell'aiutare le piante nel limitare l'assorbimento di As in suoli potenzialmente tossici.

4.3 PROVA SPERIMENTALE SU ZEA MAYS

4.3.1 Caratteristiche chimico-fisiche del suolo campionato

Il tabella 1 sono riportate le caratteristiche chimico-fisiche del suolo utilizzato per la prova su *Zea mays*.

Tabella 1: Caratteristiche chimico-fisiche del suolo di Scarlino (Gr) – località Casone	
pH (1:2,5 M/V)	8,2
EC (ms cm ⁻¹)	460
Tessitura	Franco argilloso
<i>sabbia</i> (g Kg ⁻¹)	316
<i>Limo</i> (g Kg ⁻¹)	327
<i>argilla</i> (g Kg ⁻¹)	357
Carbonio totale (g Kg ⁻¹)	8.9
Azoto totale (g Kg ⁻¹)	1.3
Calcare totale (g Kg ⁻¹)	45.1
Basi Scambiabili	
<i>K</i> ⁺ (cmol(+) Kg ⁻¹)	0.44
<i>Na</i> ⁺ (cmol(+) Kg ⁻¹)	0.61
<i>Mg</i> ²⁺ (cmol(+) Kg ⁻¹)	12.5
<i>Ca</i> ²⁺ (cmol(+) Kg ⁻¹)	13.1
C.S.C.	28
Fosforo totale (mg Kg ⁻¹)	440
Fosforo disponibile (mg Kg ⁻¹)	5
Arsenico totale (mg Kg ⁻¹)	297
Arsenico disponibile (mg Kg ⁻¹)	5

4.3.2 *Speciazione e frazione biodisponibile dell'arsenico nel suolo*

Il metodo usato nel presente studio per l'estrazione delle specie dell'arsenico ha consentito il recupero del 94,7 % rispetto all'arsenico totale. L'analisi condotta ha individuato solo le due specie inorganiche del metalloide, l'As (III) e l'As (V). La concentrazione dell'As(III) è risultata molto bassa rispetto a quella dell'As (V), quantificabile a meno dell'1% del totale. I risultati ottenuti concordano con quanto osservato da altri ricercatori (Rahaman et al., 2009). In figura 1 sono riportati i dati relativi alla concentrazione di As(III) nelle diverse frazioni del suolo. Dai dati mostrati si evidenzia una tendenza all'aumento della concentrazione di As (III) dal bulk soil alla frazione 0-2 mm (Figura 1). Sembra che le radici direttamente e/o indirettamente siano capaci di favorire un aumento della specie più mobile dell'As nelle immediate vicinanze delle radici, e ciò a prescindere dal trattamento effettuato (inoculazione o concimazione fosfatica). Come evidenziato da Fitz et al., (2002), il numero di microrganismi nella rizosfera è di un ordine di grandezza superiore rispetto al bulk soil, e la riduzione dell'As(V) ad As(III), probabilmente è da attribuire all'attività microbica nella rizofera.

In uno studio condotto su piante di girasole allevate in rhizobox su un terreno contaminato da arsenico (Ultra et al., 2007), gli autori hanno attribuito l'aumento della concentrazione dell'arsenito nella rizosfera principalmente a due fenomeni; a) meccanismi di detossificazione dell'apparato radicale, con efflusso di arsenito dalle radici e b) alla presenza di microrganismi.

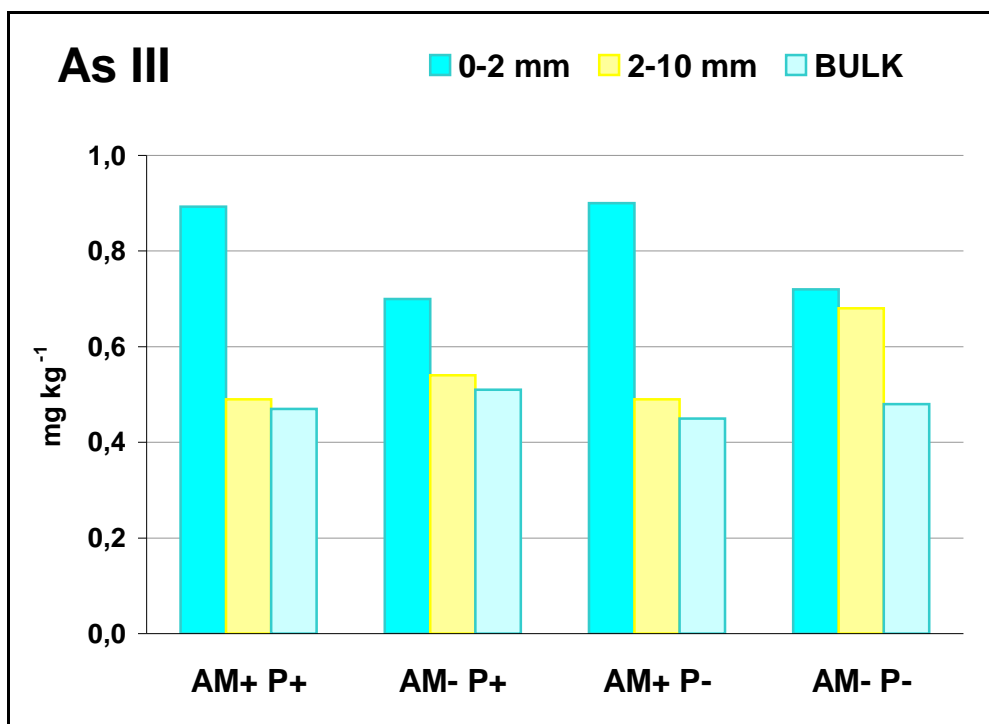


Figura. 1 Concentrazione di arsenito nelle diverse frazioni del suolo campionate al termine dell' esperimento in rhizobox.

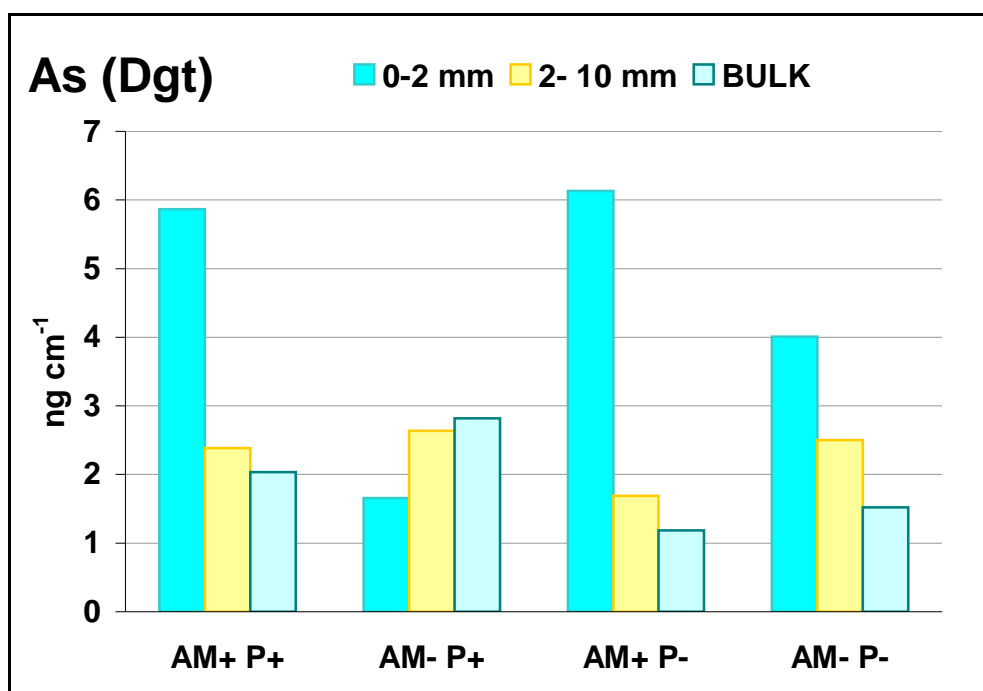


Figura 2. Concentrazione di arsenico biodisponibile nel suolo dopo 24 ore di contatto tra suolo e dispositivo DGT al termine dell'esperimento in rhizobox

Xu et al. (2007) affermano, attraverso studi condotti in idroponica, che la riduzione dell'arseniato ad arsenito (più del 95% per il pomodoro e più del 92% per il riso) in un solo giorno di osservazione può essere indotto, per la breve durata dell'esperimento, principalmente dall'efflusso di arsenito nel mezzo da parte dell'apparato radicale delle piante.

In figura 2 sono riportati i dati relativi alla frazione di As biodisponibile valutata tramite il DGT (diffusive gradients in thin films). I dati evidenziano che la frazione biodisponibile è molto piccola, rispetto alla concentrazione dell'As totale. Infatti nel suolo utilizzato l'As si trova principalmente associato agli ossidi di Fe e Al (Cozzolino et al., 2010 a). Le concentrazioni più elevate sono state osservate nella frazione 0-2mm, in tutte le tesi ad eccezione della tesi AM-P+ (figura 2). L'attività radicale e microbica nelle immediate vicinanze della radice, attraverso l'escrezione di essudati radicali, fitosiderofori e la respirazione, possono influenzare il pH e il potenziale redox del suolo, promuovendo una mobilizzazione dell'As dai componenti del suolo e quindi un aumento della frazione di As biodisponibile (Fitz & Wenzel, 2002). Dai nostri risultati sembra che laddove il P non viene applicato, l'attività radicale e microbica, in prossimità delle radici, incrementi la mobilità dell'As, ma l'assorbimento da parte della pianta è molto più lento. Anche in presenza della combinazione dei due fattori, inoculazione e concimazione, sembra verificarsi lo stesso fenomeno. Come mostrato da Smith et al., 2003, nella maggior parte delle piante il P è assimilato per via micorrizica dalla pianta, e non per via diretta, addirittura è stata osservata una inattivazione dei geni che codificano per le proteine di membrana per il trasporto del P, presenti sulla superficie radicale (Liu et al., 1998; Rausch et al., 2001). D'altra parte, altri studi (Gonzalez-Chavez et al., 2002) spiegano la capacità dei FMA di ridurre la traslocazione di As all'interno della pianta, attraverso la soppressione del sistema trasporto ad

alta affinità fosfato/arseniato in piante di *Holcus lanatus* resistenti e non resistenti all'As. Inoltre, recenti studi sembrano escludere un trasferimento di As attraverso le superfici di scambio trofico tra fungo e pianta (Chen et al., 2007; Christophersen et al., 2009). Per cui è possibile ipotizzare che, per determinate combinazioni piante/funghi se la pianta dispone di P a sufficienza, riduce l'assorbimento di P e quindi anche di As per via diretta (Cozzolino et al., 2010 b). Al contrario la quantità inferiore di arsenico biodisponibile presente nel suolo rizosferico delle piante trattate esclusivamente con la concimazione fosfatica può essere giustificata ad una maggiore velocità di assorbimento dell'arsenico da parte delle radici rispetto a quello mobilizzato.

4.3.3. Produzione di biomassa

In Tabella 2 e figura 3 sono riportati i dati relativi la produzione di biomassa delle piante. Le piante concimate con il fosforo hanno mostrato una crescita significativamente più elevata rispetto alle piante che non hanno ricevuto la concimazione. Le piante concimate con fosforo (AM+ P+ e AM- P+) hanno evidenziato un incremento di biomassa del 70% e del 41% in confronto alle piante AM+ P- e AM- P- rispettivamente (Tabella 2 e Figura 3). I risultati dunque mostrano una ridotta crescita delle piante quando queste non sono concimate con il fosforo. Infatti tali piante (AM+P- e AM- P-), rispetto a quelle concimate, hanno mostrato segni di sofferenza più evidenti, mostrando effetti attribuibili alla tossicità da As quali una germinazione ritardata, clorosi, ridotto allungamento delle radici, ridotta produzione di biomassa sia fogliare che radicale, senescenza delle foglie. Risultati simili sono stati riportati in altri studi (Gulz et al., 2005; Cao et al., 2007; Pigna et al., 2009; Cozzolino et al., 2010a,b). Pigna et al., (2009) hanno mostrato che, in assenza di concimazione fosfatica, giovani piantine di grano (*Triticum*

durum) irrigate con acqua contenente 2 mg L^{-1} di As, presentavano crescita radicale e fogliare stentata. In uno studio condotto su piante di lattuga (*Lactuca sativa*), Cozzolino et al., (2010b) hanno osservato che la combinazione di concimazione fosfatica e inoculazione con *Glomus intraradices* abbia notevolmente favorito il pieno sviluppo delle piante, consentendo il raggiungimento di dimensioni perfettamente commerciabili alla fine del ciclo colturali.

L'arsenico infatti a causa della somiglianza chimica con il fosforo è trasportato attraverso il sistema di cotrasporto per il fosfato presente sulla membrana plasmatica delle cellule radicali (Ullrich-Erebius et al., 1989) e un forte accumulo nelle radici può causare un disturbo del metabolismo del fosforo interferendo per esempio con la sintesi dell'ATP.

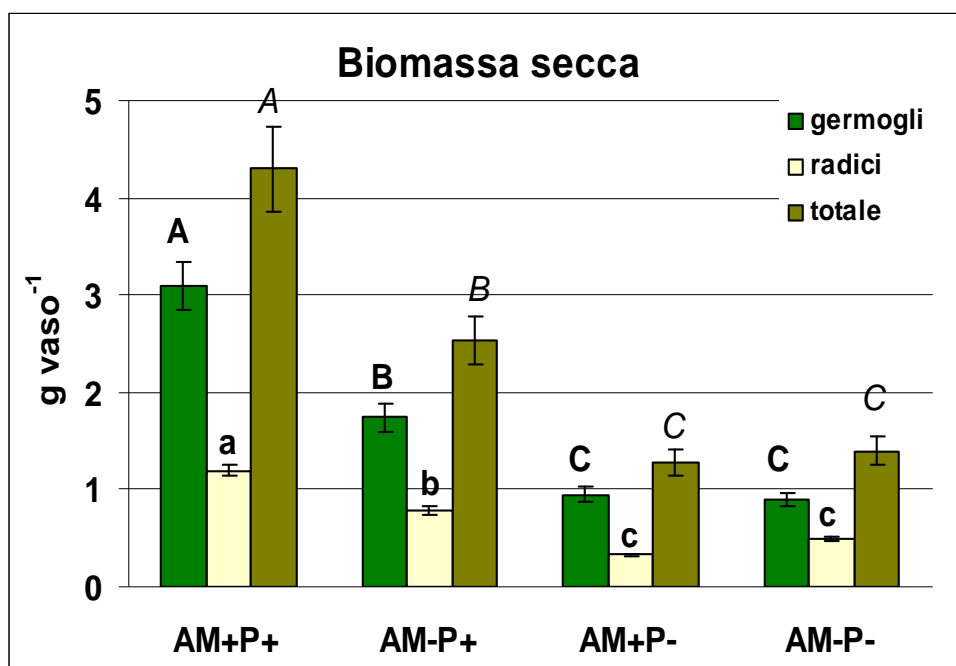


Figura 3. Biomassa prodotta

Tabella. 2: secca Biomassa secca prodotta (g) da <i>Zea mays</i>					
Tesi	Foglie		Radici		totale
AM+ P+	3,10 ± 0,44	A	1,19 ± 0,16	a	4,29
AM - P+	1,74 ± 0,21	B	0,79± 0,07	bc	2,53
AM+ P -	0,95 ± 0,02	C	0,33 ± 0,03	cd	1,28
AM - P -	0,9 ± 0,02	D	0,5 ± 0,07	d	1,50

4.3.4. Contenuto e concentrazione di fosforo negli organi vegetali

In tabella 3 e in figura 4 è possibile notare come le piante AM+ P- pur non essendo state concimate con il fosforo mostrano una concentrazione del nutriente pari a quella delle piante AM+ P+ e maggiore rispetto a quella delle AM-P+. Questo dato conferma l'importanza dell'inoculo micorrizico nel migliorare la nutrizione fosfatica delle piante. Il beneficio che il mais riceve quando è inoculato e nello stesso tempo concimato con il fosforo (AM+ P+) rispetto alle altre tesi sperimentali è evidenziato oltremodo osservando il contenuto di fosforo che tali piante accumulano nei loro organi vegetali (figura 4, figura 5 e tabella 3). Le piante AM+P+, infatti, hanno accumulato una quantità di fosforo nelle radici e nei germogli pari a 4,78 e 8,97 mg pianta⁻¹ rispettivamente, più del doppio di quello osservato nelle piante che hanno ricevuto la sola concimazione fosfatica (AM- P+). Se si considera il contenuto di arsenico e fosforo accumulato per vaso è chiaro che questi due elementi mostrano un andamento opposto nell'assimilazione da parte del mais. Infatti mentre l'arsenico è in gran parte non traslocato dalle radici ai germogli (la quantità di arsenico è dalle 13 alle 18 volte maggiore nelle radici rispetto alla quantità presente nei germogli), i dati sul contenuto di fosforo negli organi vegetali mostrano al contrario una una maggiore traslocazione

del nutriente verso l'apparato epigeo delle piante (il contenuto nelle radici è dalle 0,3 alle 2,5 volte minore rispetto al contenuto nei germogli).

In generale le piante concimate nonostante abbiano un contenuto maggiore di As, hanno migliorato la traslocazione del fosforo rispetto alle piante che non hanno ricevuto la concimazione. Probabilmente la nutrizione fosfatica in concomitanza con l'inoculo micorizzico, il quale gioca un ruolo chiave nell'assorbimento dei nutrienti, riducono in maniera sensibile l'effetto fitotossico dovuto alla presenza dell' arsenico nel suolo.

Tab.3: Concentrazione e contenuto di fosforo nei tessuti vegetali di <i>Zea mays</i>								
	Concentrazione di P (mg g⁻¹)				Contenuto di P (mg pianta⁻¹)			
Tesi	foglie		Radici		Foglie		Radici	
AM+ P+	2,89 ± 0,29	AC	4,02 ± 0,56	a	8,97 ± 0,72	A	4,78 ± 0,38	A
AM - P+	2,11 ± 0,21	B	1,94 ± 0,27	b	3,67 ± 0,29	B	1,54 ± 0,12	B
AM+ P-	3,58 ± 0,32	C	4,16 ± 0,58	a	3,40 ± 0,27	B	1,34 ± 0,11	B
AM - P-	2,77 ± 0,28	A	2,74 ± 0,38	c	2,50 ± 0,20	C	1,34 ± 0,10	B

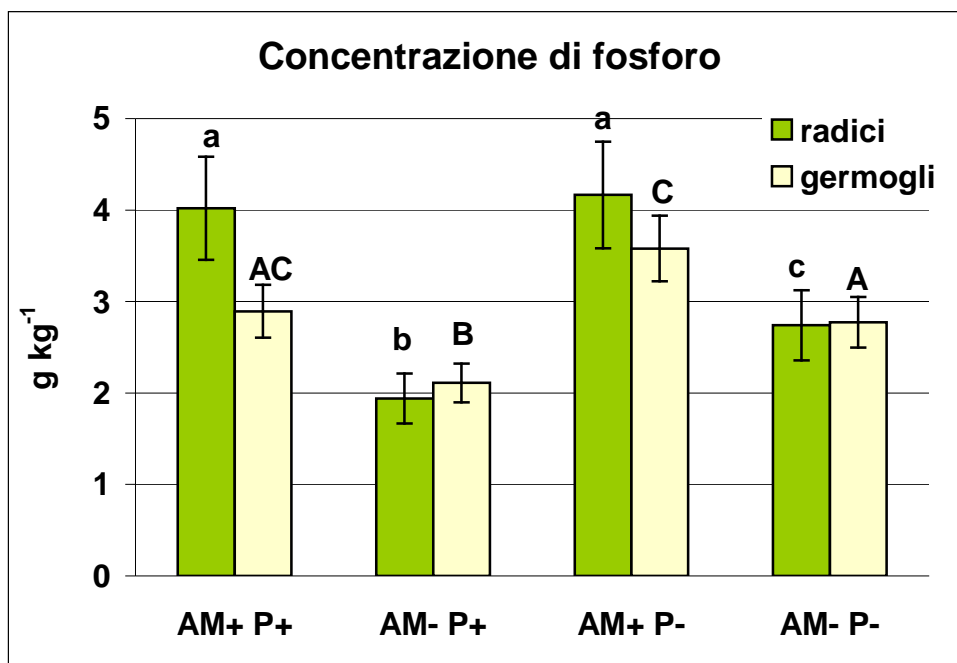


Figura 4 Concentrazione del fosforo in radici e germogli di *Zea mays*

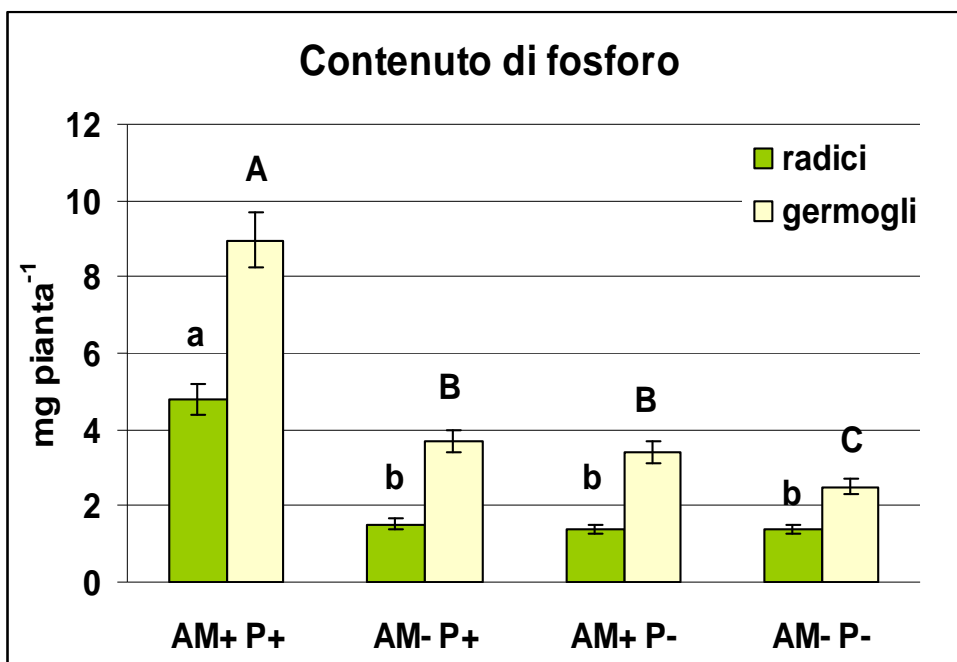


Figura 5 Contenuto del fosforo in radici e germogli di *Zea mays*

4.3.5. Contenuto, concentrazione e speciazione dell'arsenico negli organi vegetali

In tabella 4 e nelle figure 6 e 7 sono riportati i dati della concentrazione e del contenuto di arsenico nelle radici e nei germogli. La concentrazione di arsenico nella parte epigea del mais è risultata piuttosto bassa mentre nelle radici i valori sono circa 40 volte più elevati. Infatti nelle radici delle piante delle diverse tesi si osserva mediamente una concentrazioni di arsenico di circa $13 \mu\text{g g}^{-1}$, mentre nei germogli mediamente la concentrazione di arsenico è di circa $0,35 \mu\text{g g}^{-1}$ (figura 6 e tabella 4).

Il contenuto di As nelle radici e nei germogli è risultato significativamente maggiore nelle piante concimate con P, osservazione spiegabile con la maggiore biomassa prodotta in queste piante (figura 7). Sebbene le piante inoculate hanno un contenuto di As più elevato delle piante non inoculate, l'evidente minore fitossicità del metalloide deve essere attribuita ad un effetto diluizione conseguente alla maggiore crescita. Infatti, come illustrato in figura 7, le piante trattate solo con la concimazione fosfatica (AM- P+) accumulano una quantità di arsenico doppia, sia nelle radici che nei germogli, rispetto alle AM- P-. Un ridotto assorbimento di As è un meccanismo di tolleranza che può mettere in atto la pianta, tuttavia la presenza di un'adeguata concentrazione di P disponibile nel suolo, può evitare danni ai tessuti della pianta. Infatti, la ridotta sensibilità all'As quando la disponibilità di P è elevata è da attribuire presumibilmente ad un più elevata concentrazione di P a livello citoplasmatico, che riduce la tossicità cellulare dell'As, per la competizione As/P nelle diverse vie metaboliche, in particolare nella sintesi dell'ATP (Pigna et al., 2009 e referenze all'interno).

Come per il suolo, solo le specie inorganiche dell'As (arsenito, As III, e

arseniato, As V) sono state trovate dopo estrazione con acqua/metanolo. Dal momento che le specie organiche non sono state rinvenute, abbiamo espresso i dati relativi alla concentrazione di As III nelle radici e nei germogli come valore percentuale rispetto all'As inorganico totale (Figura 8). Nelle radici la forma predominante è data dall'As (V), infatti l'As(III) è presente con valori da 10-32%. Al contrario, nei germogli prevale la forma ridotta (35-76%). Le percentuali maggiori di As (III) sono state evidenziate nelle piante concimate con P, sia nelle radici e sia nelle foglie, tuttavia i valori più elevati sono stati rilevati nelle piante concimate e inoculate.

Tab.4: Concentrazione e contenuto di arsenico nei tessuti vegetali di <i>Zea mays</i>								
	Concentrazione di As ($\mu\text{g g}^{-1}$)				Contenuto di As ($\mu\text{g pianta}^{-1}$)			
Tesi	Germoglio		Radici		Germoglio		Radici	
AM+ P+	0,33 \pm 0,06	A	13,0 \pm 2,57	a	1,03 \pm 0,20	A	15,5 \pm 3,03	A
AM - P+	0,39 \pm 0,07	A	14,8 \pm 1,87	a	0,68 \pm 0,12	B	11,6 \pm 1,47	A
AM+ P-	0,34 \pm 0,06	A	12,9 \pm 0,49	a	0,32 \pm 0,06	C	4,27 \pm 0,16	B
AM - P-	0,34 \pm 0,09	A	11,4 \pm 0,58	a	0,31 \pm 0,08	C	5,69 \pm 0,27	C

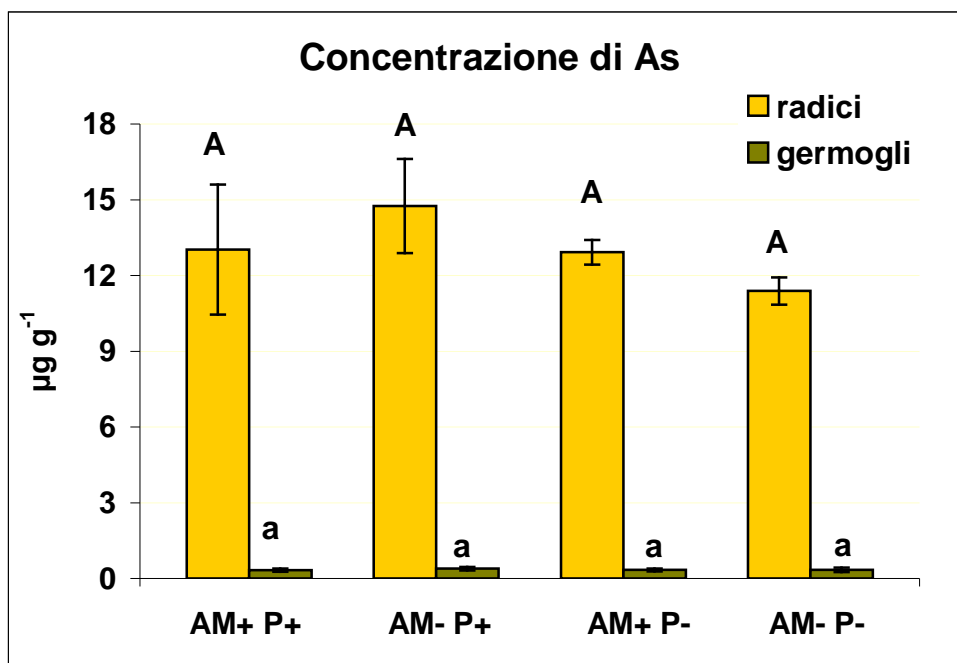


Figura 6 Concentrazione di arsenico in radici e germogli di Zea mays.

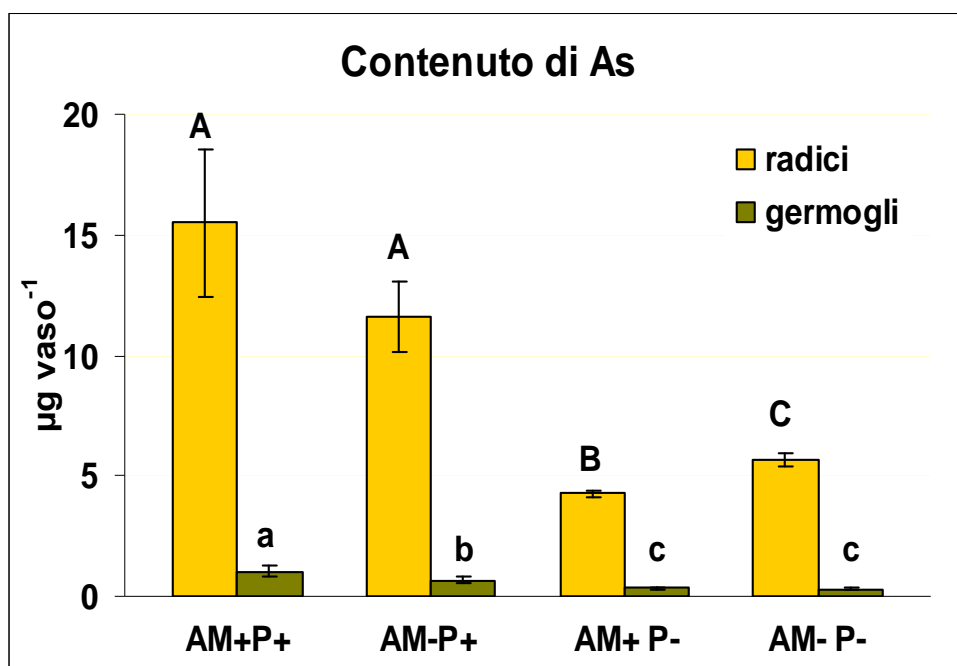


Figura 7 Contenuto di arsenico in radici e germogli di mays

Le piante inoculate e non concimate, invece accumulano più As (V) nelle radici rispetto agli altri trattamenti (figura 8). Yu et al., (2009) trovarono in radici di mais, coltivate in una soluzione contenente le due forme di As inorganico, che l'inoculazione con funghi micorrizici arbuscolari inibisce l'assorbimento di As(V), ma non ha alcun effetto sull'assorbimento di As (III). Le ife fungine possono penetrare direttamente all'interno della corteccia radicale, scambiando elementi assorbiti dal suolo (Lee e George, 2005). Per cui, oltre agli effetti dovuti ai cambiamenti morfologici e fisiologici che hanno luogo nella radice in seguito all'inoculazione, le ife micorriziche potrebbero selettivamente trasportare alcune forme, conducendo al diverso accumulo di As (III) e As (V) nel mais. Tuttavia considerando che anche la concimazione fosfatica sortisce lo stesso effetto, i risultati potrebbero indicare che la riduzione dell'As avviene all'interno della pianta come suggeriscono i risultati di Pickering et al., (2000). L'inoculazione e la concimazione fosfatica con la concimazione fosfatica potrebbero influenzare la reazione di riduzione. Il miglioramento della nutrizione fosfatica potrebbe esercitare un'influenza su questo processo.

La riduzione dell'arseniato ad arsenito e la formazione di complessi As(III)-composti tiolici con la loro successiva compartimentalizzazione all'interno dei vacuoli cellulari, come riportato in letteratura, può rappresentare un altro meccanismo che la pianta mette in atto per far fronte alle concentrazioni elevate di arsenico nel substrato di crescita. Infatti Bliek et al., (2008) riportano che in condizioni di abbondanza di P assorbito dalla pianta, può essere raggiunta un'accresciuta tolleranza all'As attraverso la riduzione dell'arseniato ad arsenito e con il seguente sequestro all'interno dei vacuoli del complesso As(III)-fitochelatine. È possibile anche ipotizzare che l'assorbimento di arseniato in presenza di fosfato sia limitato, mentre il

trasporto di arsenito non è influenzato dal fosfato (Chaturvedi, 2006).

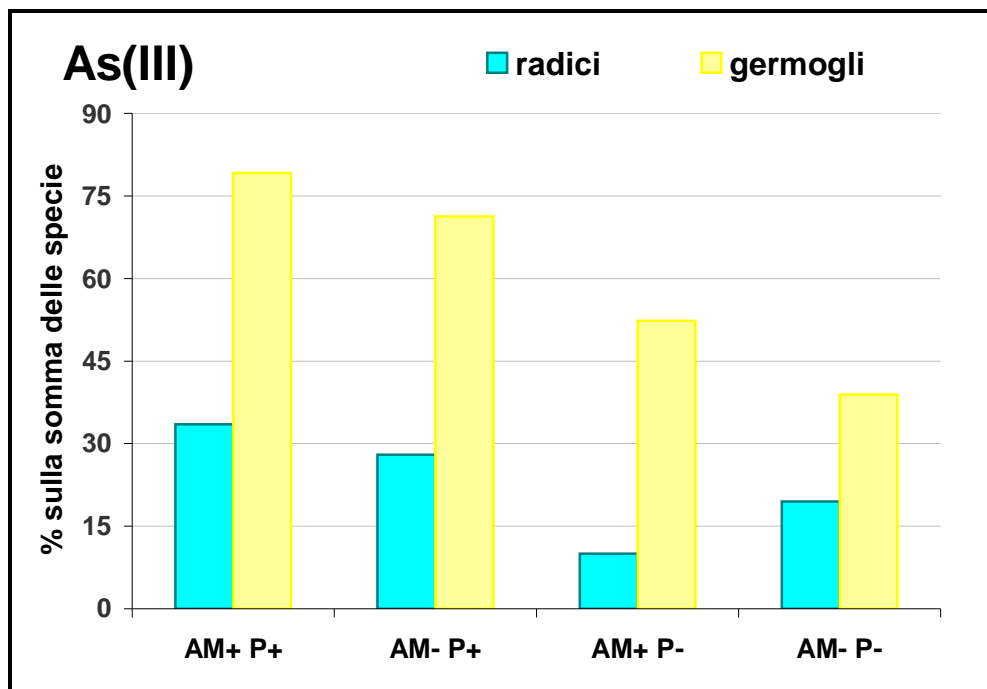


Figura 8 Percentuale di As (III) sulla somma delle specie in radici e germogli

In figura 9 sono presentate le relazioni tra la concentrazione di As biodisponibile (As_{DGT}) e la concentrazione di As misurata nelle radici e nei germogli. Le piante sono state separate in due gruppi, con e senza P, con l'obiettivo di confrontare piante che hanno risposto in maniera simile alla tossicità del suolo. È necessario precisare che il flusso di As verso la resina nel sistema DGT considera solo l'As (III) e l'As(V) e considera la concentrazione iniziale in soluzione e la velocità di rifornimento dalla fase solida del suolo. Al contrario, nel sistema suolo-mais, l'assorbimento di As non è solo in funzione delle proprietà del suolo e delle modificazioni indotte dagli organismi viventi in esso, bensì anche della fisiologia della pianta, dalla fisiologia di *G. intraradices* e dai risultati della relazione tra mais e *Glomus*.

Dai grafici riportati in figura 9 si evince chiaramente che il DGT può

permettere di ottenere delle indicazioni abbastanza realistiche sull'assorbimento di As da parte della pianta. Le correlazioni tra As_{DGT} e concentrazione di As nella pianta sono migliori nei trattamenti senza concimazione fosfatica, probabilmente il P modifica lo sviluppo e l'assorbimento della pianta. Altro dato interessante che emerge, sebbene nel mais vi sia una ridotta traslocazione, le correlazioni sono simili, sia nelle radici che nei germogli.

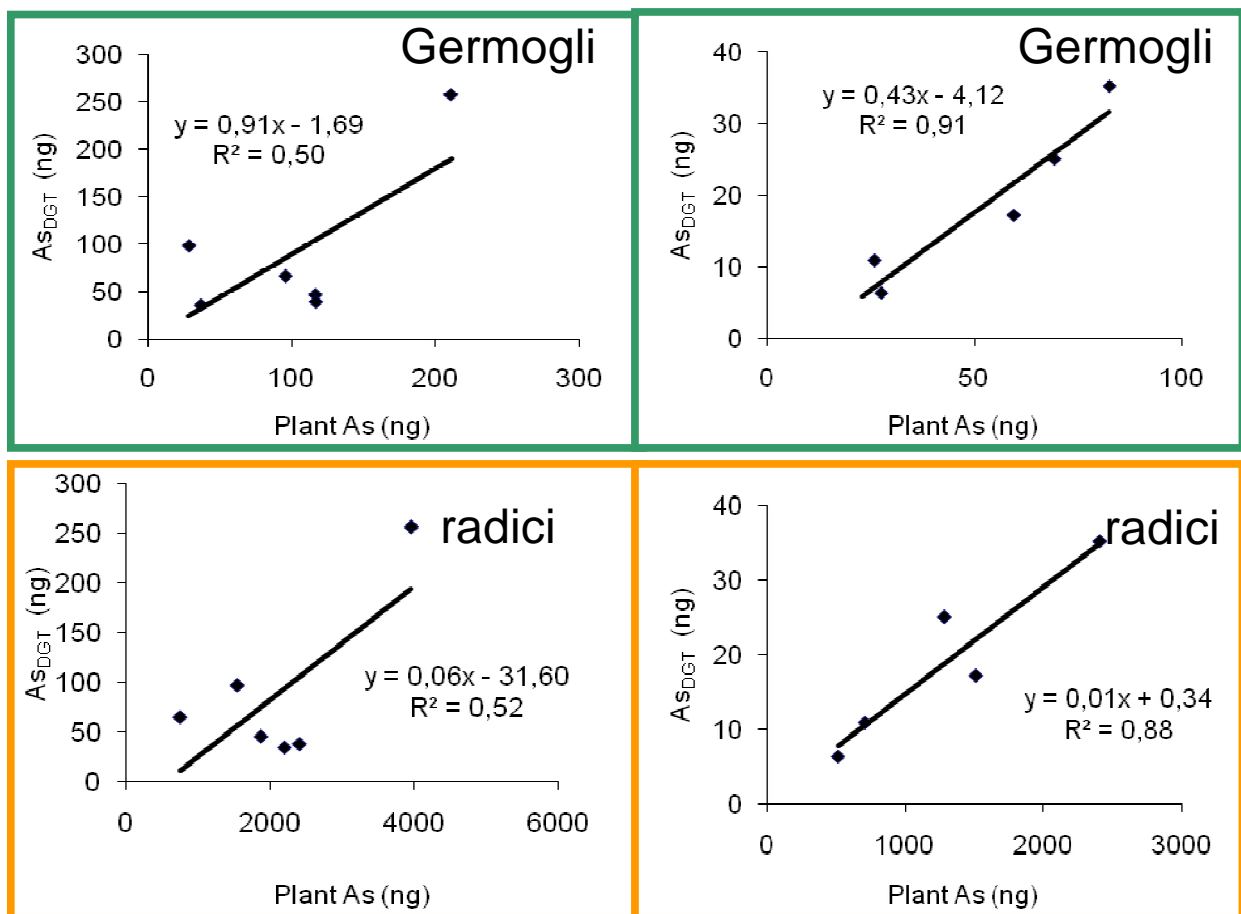
*P+**P-*

Figura 9. Relazione tra massa dell'arsenico biodisponibile (determinate con tecnologia DGT) e il contenuto di arsenico totale nelle piante concimate e non concimate con fosforo.

4.3.6. CONCLUSIONI

La presenza di As nei suoli indagati è considerevole, tuttavia non sembra particolarmente pericolosa, come suggeriscono i risultati della speciazione nel suolo e l'analisi con il DGT, in quanto le concentrazioni del metalloide determinate sono estremamente basse, comparate alla concentrazione di As totale nel suolo. Comunque l'esperienza condotta dimostra che in questo suolo la crescita di una pianta di interesse agronomico come il mais può essere molto difficile, in assenza di concimazione fosfatica. I meccanismi, coinvolti nella tolleranza all'As nel mais, potrebbero non essere sufficienti per proteggere la pianta, anche in presenza di concentrazioni basse di As disponibile, ma con un suolo molto poco dotato di P disponibile.

L'accumulo di questo elemento è regolato principalmente a livello radicale: la concentrazione di As è più elevata nella radice, mentre la concentrazione di As(III) e di P sono più elevate nella parte aerea.

La percentuale di As (III) nella pianta è 100 volte più elevata che nel suolo. La rizosfera è una “scatola nera” dove gli essudati radicali e microbici, i microrganismi e il suolo interagiscono e determinano il rilascio delle forme labili dell'As e la sua conversione da una forma all'altra.

Riassumendo, nel presente studio, è stato osservato che la tolleranza all'As nel mais può essere dovuta a: i) ridotto assorbimento di As; ii) crescita rapida e vigorosa e maggiore assorbimento di P, con l'inoculazione e la concimazione fosfatica, che bilancia l'eccesso di As potenzialmente assorbito, e iii) trasformazione dell'As(V) ad As(III), e compartimentalizzazione.

I risultati mostrano che l'inoculazione congiuntamente alla concimazione fosfatica possono essere molto efficaci per incrementare la produzione di biomassa e la nutrizione fosfatica, riducendo al contempo la sensibilità della pianta all'elemento tossico. Tali conclusioni potrebbero avere una utilità pratica nel caso di operazioni di recupero e stabilizzazione di suoli ricchi di As.

Bibliografia

Abernathy, C.O., Liu, Y.P., Longfellow, D., Aposhian, H.V., Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., Waalkes, (1999). M. Environ. Health Perspect. 107, 593.

Adriano, D.C., Page, A. L., Elsewi, A.A., Chang, A.C., and Straughan, I., (1980). Utilization and disposal of fly ash and other residues in terrestrial ecosystems: A review. J. Environ. Qual. 9, 333-334.

Adriano D.C., (1986). Trace Elements in the Terrestrial Environment. Springer-Verlag, New York, pp. 533.

Ahmed, M., and Rahman, M.M. (2001). Water Supply and Sanitation-Rural and Low-Income Urban Communities, ITB-Bangladesh Center for Water Supply and Waste Management, Dhaka Bangladesh. Christen, K., (1999). Arsenic standard for drinking water too high, National Research Council Says. Environ. Sci. Tech. A, 188.

Alloway, B. J. (1992) "Arsenic" In: "Heavy metals in soils" (2nd ed) Blackie, Glasgow. pp. 105-121

Asher C.J., Reay P.F., (1979) Arsenic uptake by barley seedlings. Aust J Plant Physiol 6: 459-466.

Bencko, V. and Simon, K. (1977) "Health aspects of burning coal with a high arsenic content" Environ. Res. 13: 378-385

Benramdane, L., Bressolle F., Vallon, J. J., (1999). J. Chromatogr. Sci., 37, 330.

Bliek, T., Bleeker, P. M., Vooijs, R., Arnetoli, M., & Schat, H. (2008). The role of arsenate reductase in arsenate toxicity and tolerance in plants. Presented in 20th New Phytologist Symposium "Arsenic: Unravelling its metabolism and speciation in plants", Aberdeen, Scotland, UK.

Blute, N. K.; Brabander, D. J.; Hemond, H. F.; Sutton, S. R.; Newville, M. G.; Rivers, M. L., (2004) Arsenic sequestration by ferric iron plaque on cattail roots. Environ. Sci. Technol. , 38, 6047-6077.

Bowell, R. J. (1994). Sorption of arsenic by iron oxides and oxyhydroxides in soils. Appl. Geochem. 9, 279-286.

Buck W.B. (1978) Toxicity of inorganic and aliphatic organic arsenicals. In: Toxicity of Heavy Metals in the Environment. Ed. Oehme F.W., M. Dekker , New York, 357-369.

Burlo, F., Guijarro, L., Carbonell-Barrachina, A. A., Valero, D., e Martinez-Sanchez, F. (1999). Arsenic species: effects on and accumulation by tomato plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1247–1253.

Cao, Q., Hu, Q., Khan, S., Wang, Z., Lin, A., Du, X., Zhu, Y., (2007). Wheat phytotoxicity from arsenic and cadmium separately and together in solution culture and in a calcareous soil. *J. Hazard. Mat.* 148, 377-382

Carbonell-Barrachina, A. A., Burlo, F., Burgos-Hernandez, A., Lopez, E., e Mataix, J. (1997). The influence of arsenite concentration on arsenic accumulation in tomato and bean plants. *Scientia Horticulturae*, 71, 167–176.

Caruso, J. A., Heitkemper, D. T., B’Hymer, C. (2001). *Analyst*, 126, 136.

Chaturvedi, I., (2006). Effects of arsenic concentrations and forms on growth and arsenic uptake and accumulation by indian mustard (*Brassica juncea* L.) genotypes. *J. Cent. Eur. Agric.* 7, 31-40.

Chen, B., Xiao, X., Zhu, Y.G., Smith, F.A., Xie, Z.M., Smith, S.E., (2007). The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* gives contradictory effects on phosphorus and arsenic acquisition by *Medicago sativa* Linn. *Sci. Total Environ.* 379, 226–234.

Christophersen, H.M., Smith, F.A., Smith, S.E., (2009). Arbuscular mycorrhizal colonisation reduces arsenate uptake in barley via down-regulation of transporters in the direct epidermal phosphate uptake pathway. *New Phytol.*, doi:10.1111/j.1469-8137.2009.03009.x.

Chilvers, D.C., Peterson, P.J. , (1987) Global cycling of arsenic. In: Hutchinson TC, Meema KM. Lead, mercury, cadmium and arsenic in the environment. John Wiley & Sons. 31:279-301.

Clarkson T.W. (1993) Molecular and ionic mimicry of toxic metals. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 32, 545-571.

Cornell R.M. and Schwertmann U. (1996). *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrences and Uses.* VCH, Weinheim.

Cozzolino, V., Pigna, M., Di Meo, V. , Caporale, A. G., Violante, A., and Meharg, A. A., (2010a), Influence of Phosphate Addition on The Arsenic Uptake by Wheat (*Triticum durum*) grown in Arsenic Polluted soils. *Fresenius Environmental Bulletin* 19,839-835

Cozzolino, V., Pigna, M., V. Di Meo, V., Caporale, A.G., Violante A., (2010b) Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation and phosphorus supply on the growth of *Lactuca sativa* L. and arsenic and phosphorus availability in an arsenic polluted soil under non-sterile conditions. *Applied Soil Ecology* 45 : 262–268.

Craig, P.J. (1986). *Organometallic Compounds in the Environment. Principles and*

Reactions, Longman Group, Harlow, UK,.

Cullen, W.R., Reimer, K.J. (1989) .Chem. Rev. 89, 713.

De Cristofaro A., He J.Z., Zhou D. and Violante A. (2000). Sorption of phosphate and tartrate on hydrxy-aluminum-oxalate coprecipitates. Soil Sci. Soc. Am. J. 64: 1347-1355.

Dagnac, T., Padro´, A., Rubio, R., Rauret, G. (1999). Talanta 48, 763.

Davison, W., Zhang, H., Grime, G.W., (1994). Performance-characteristics of gel probes used for measuring the chemistry of pore waters. Environ. Sci. Technol. 28, 1623-1632.

Deuel, L. E. and Swoboda, A. R. , (1972). Arsenic solubility in a reduced Environment. Proc. Soil Sci. Soc. Am., 36, 276-8.

Duxbury, J. M.; Panaullah, G. (2007). Remediation of Arsenic for Agriculture Sustainability, Food Security and Health in Bangladesh; FAO Water Working Paper; FAO: Rome, p 28.

Fiskell, J. G. A., Mansell, R. S., Selim, H. M., Martin, F. G. (1979) J. Environ. Qual. 8, 579.

Fitz W.J., Wenzel, W.W., (2002). Arsenic transformation in the soil–rhizosphere–plant system: fundamentals and potential application to phytoremediation. J Biotech 99:259–278.

Fitz, W.J., Wenzel, W. W., Zhang, H., Nurmi, J., Stipek, K., Fiscerova, Z., Schweiger., P., Kollensperger, G., Ma, L. Q., and Stingerder, G., (2003). Rhizosphere Characteristics of the Arsenic Hyperaccumulator *Pteris vittata* L. and Monitoring of Phytoremoval Efficiency. Environ. Sci. Technol., 37, 5008-5014.

Galli, U., Schuepp, H., Brunold, C., (1995). Thiols of Cu-treated maize plants inoculated with the arbuscular-mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. Physiology Plantarum, v.94, p. 274-253.

Garcia-Manyes, S., Jimenez, G., Padro, A., Roser Rubio, G., (2002). Rauret Arsenic speciation in contaminated soils Talanta 58,97–109

Gebel, T.W. (2001) Int. J. Hyg. Environ. Health. 203, 249.

Gonzalez-Chavez, C., Harris, P.J., Dodd, J., Meharg, A.A., (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi enhanced arsenate resistance on *Holcus lanatus*. New Phytol. 155, 163–171.

Griffin, R. A., Burau, R. G. (1974) Soil Sci. Soc. Am. Proc. 38: 892.

Gultz, P.A., Gupta, S., Schulin, R., (2005). Arsenic accumulation of common plants from contaminated soils. *Plant Soil* 272, 337–347.

Hansel, C. M.; La Force, M. J.; Fendorf, S.; Sutton, S., (2002). Spatial and temporal association of As and Fe species on aquatic plant roots. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36, 1988-1994.

Heitkemper, D. T. , Vela, N. P. , Stewart K. R., Westphal, G. S., (2001). *J. Anal. At. Spectrom.*, 16, 299.

Helgesen H., Larsen, E. H., (1998). *Analyst*, , 123, 791.

Huang P.M. and Violante A. (1986). Influence of organic acids on crystallization and surface properties of precipitation products of aluminum. pp. 159-221 In: (P.M. Huang and M. Schnitzer, Eds) *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*. Spec. Publ. No. 17. Soil Science Society of America, Madison WI.

Huang, P.M. , Oscarson, D.W., Liaw, W.K. (1982) *U.T. Hammer, Hydrobiologia* 91, 315.

Huang P.M. and Violante A. (1986). Influence of organic acids on crystallization and surface properties of precipitation products of aluminum. pp. 159-221 In: (P.M. Huang and M. Schnitzer, Eds) *Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes*. Spec. Publ. No. 17. Soil Science Society of America, Madison WI.

Hsu, P.H. (1989). Aluminum hydroxides and oxyhydroxides., pp. 331-378. In: (J.B. Dixon and S.B. Weed, Eds), *Minerals in Soil Environments*. 2nd edition. Soil Sci. Soc. Am., Book Ser. no.1, Madison, WI.

Huang, P. M. (1975) 'Retention of As by hydroxy: aluminium on surfaces of micaceous mineral colloids' *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 39, 271-274

Inskeep W. P. (1989). Adsorption of sulfate by kaolinite and amorphous iron oxide in the presence of organic ligands. *J. Environ. Qual.* 18: 379-385.

Irvin, T.R., Irgolic, K.J. (1995) *Appl. Organomet. Chem.* 9, 315.

Jiang, Q. Q. and Singh, B. R. (1994) "Effect of different forms and sources of arsenic on crop yield and arsenic concentration", *Wat. Air Soil Poll.* 74: 321-343

Jin, Q., Liang, F., Zhang, H., Zhao, L., Huan, Y., Song, D., (1991). *Trends Anal. Chem.* 18, 479.

Joner, E. J., Leyval C., (1997) Uptake of ¹⁰⁹ Cd by roots and hyphae of a *Glomus mosseae*/ *Trifolium subterraneum* mycorrhiza from soil amended with high and low concentrations of cadmium. *New Phytologist* Volume 135, Issue 2, pages 353–360.

Koch, I., Wang, L., Ollsen, C., Cullen, W. R., Reimer, K. J., (2000). Environ. Sci. Technol., 34, 22.

Kosnett, M.J. (1998) in: W.R. Chappell, Ch. O. Abernathy, R.L. Calderon (Eds.), Proceedings of the 3rd International Conference on Arsenic Exposure Health Effects. Elsevier, Oxford, , p. 349.

Kuehnelt, D., Lintschinger, J., Goessler, W., (2000). Appl. Organomet. Chem., 14, 411.

Lee RB (1982) Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. Ann Bot 50: 429.

Lee, D. A., Chen, A., & Schroeder, J. I. (2003). Ars1, an Arabidopsis mutant exhibiting increased tolerance to arsenate and increased phosphate uptake. The Plant Journal, 35, 637–646.

Lee, Y. J., George E., (2005). Contribution of mycorrhizal hyphae to uptake of metal cations by cucumber plants at two levels of phosphorus supply. Plant and soil. 278: 361-370.

Leonard, A. (1991) "Arsenic" in: "Metals and Their Compounds in the Environment, Occurrence, Analysis, and Biological Relevance" 2nd ed. Merian, E. in cooperation with Clarkson et al. (eds), Weinheim, VCH., pp. 751-773.

Leyval, C., Turnau, K., Haselwandter, K. (1997). Effect of heavy metal pollution on mycorrhizal colonization and function: physiological, ecological and applied aspects. Mycorrhiza 7, p.139-153.

Liu F., Xu F. L., Li X. Y., Wang Y. J. E. and Zeng G. Q. (1994). Types of crystalline iron oxides and phosphate adsorption in variable charge soils. Pedosphere. 4, 35-46.

Liu, H., Trieu, A.T., Blaylock, L.A., Harrison, M.J., (1998). Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and response to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. Mol. Plant Microbe Interact. 11, 14–22.

Liu F., He J., Colombo C. and Violante A. (1999). Competitive adsorption of sulfate and oxalate on goethite in the absence or presence of phosphate. Soil Science. 164, 3: 180-189.

Liu F., De Cristofaro A., and Violante A. (2001) Effect of pH phosphate and oxalate on the adsorption/desorption of arsenate on/from goethite. Soil Sci. 166: 197-208.

Liu, Y., Zhu, Y.G., Chen, P., Christie, P., Li, X.L., (2005). Yield and arsenate uptake of arbuscular mycorrhizal tomato colonized by *Glomus mosseae* BEG167 in As spiked soil under glasshouse conditions. Environ. Int. 31, 867–873.

Liu , W. J., Zhu Y. G., Hu , Y., W Iliams, P. N., Gault, G., Meharg, A. A., Charnock, J. M., and Smith, F.(2006).Arsenic Sequestration in Iron Plaque, Its Accumulation and Speciation in Mature Rice Plants (*Oryza Sativa* L.). A .Environ. Sci. Technol. , 40, 5730-5736.

Loebenstein, J.R., (1993). Arsenic. In "Minerals Yearbook 1990". U.S. Govt.Printing Office, Washington, D.C. 167-170.

Lucidano, A. (1989) Inquinamento da imprenditoria industriale: i metalli pesanti. Atti S.I.S.Vet. XLIII, 85-98.

Madsen, A.D., Goessler, W. , Pedersen, S. N., Francesconi, K. A., (2000).J. Anal. At. Spectrom., , 15, 657.

Maher, W., Butler, E., (1988).Appl. Organomet. Chem., , 2, 191.

Marshner, H., Dell, B., (1994). Nutrient uptake in mycorrhizal symbiosis. Plant Soil 159, p. 89-102

Meharg, A.A., Macnair, M.R., (1992) Suppression of the high-affinity phosphate uptake system: a mechanism of arsenate tolerance in *Holcus lanatus* L. J Exp Bot 43: 519–524.

Meharg, A.A., Naylor, J., & Macnair, M. R., (1994). Phosphorus nutrition of arsenate-tolerant and nontolerant phenotypes of velvet grass. Journal of Environmental

Quality, 23, 234–238.

Meharg AA, Hartley-Whitaker J (2002) Arsenic uptake and metabolism in arsenic resistant and nonresistant plant species. New Phytol 154: 29–43.

Meharg, A.A., (2006). Mechanism of plant resistance to metal and metalloid ions and potential biotechnological applications. Plant and Soil 274, 163-174.

Michel, P. (1987) L'arsenic en milieu marin: sinthese bibliographique. Rev. Trav. Inst. Peches marit., 49, 175-185.

Momplaisir G.M., Blais J.S., Quintero M., Marshall W. (1991) Determination of Arsenobetaine, Arsenocholine, and Tetramethylarsonium Cations in Seafood and Human Urine by Hight-Performance Liquid Chromatography-Thermochemical Hydride Generation-Atomic Absorption Spectrometry. J. Agric. Food Chem, 39, 1448-1451

Munoz, O., Vélez, D., Montoro, R.,(1999).Analyst, 124, 601.

Nagarajah S., Posner A. M. and Quirk J. P. (1970). Competitive adsorption of phosphate with polygaracturonate and other organic anions on kaolinite and oxide surface. Nature. London. 228: 83-84.

Nriagu, J.O. ,(1994). Arsenic in the environment. Part I. Adv. Environ. Sci. Technol. 26. John Wiley & Sons. New York.

Onishi, H. and Sandell, E. B. (1955) 'Geochemistry of arsenic' Geochim. Cosmochim. Acta 7: 1-33

Onishi H. (1969). Arsenic in: K.H. Wedepohl (Ed.), Handbook of Geochemistry, Springer-Verlag, New York, Vol. II-2, Chapter 33.

O'Really S.E., Strawn D.G. and Sparks D.L. (2001). Residence time effects on arsenate adsorption/desorption mechanisms on goethite. Soil Sci. Soc. Am. J. 65:67-77.

Peryea F.J. (1991). Phosphate induced release of arsenic from soil contaminated with lead arsenate. Soil Sci. Soc. Am. J. 55: 1301-1306.

Pickering IJ, Prince RC, George MJ, Smith RD, George GN, Salt DE. (2000). Reduction and coordination of arsenic in Indian mustard. Plant Physiology 122: 1171–1177.

Pierce, M.L., and C.B. Moore. (1982). Adsorption of arsenite and arsenate on amorphous iron hydroxide. Water Res. 16:1247-1253.

Pigna, M., Cozzolino, V., Violante, A., Meharg, A.A., (2009). Influence of phosphate on the arsenic uptake by wheat (*Triticum durum* L.) irrigated with arsenic solutions at three different concentrations. Water Air Soil Pollut. 197, 371–380.

Pohl, B., Bachmann, K. (1986) Fresenius' Z. Anal. Chem. 323, 859.

Rahman, M. M., Chen, Z. L., Naidu, R. (2009) Extraction of arsenic species in soils using microwave-assisted extraction detected by ion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry Environ Geochem Health 31, 93-102.

Rausch, C., Darram, P., Brunner, S., Jansa, J., Laloi, M., Leggewie, G., et al., (2001). A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. Nature 414, 462–470.

Reilly, C. (1991) Metal Contamination of Food. 2nd ed., Elsevier, Essex, 152-175.

Sadiq, M. (1996) 'Arsenic Chemistry in Soils: an overview of Thermodynamic Predictions and Field Observations' Water, Air and Soil Pollut. 93: 117-136.

Sadler, R., Olszowy, H., Shaw, G., Bilotto, R. and Cornell, D. (1994) "Soil and water contamination by arsenic from tannery Waste", Wat. Air Soil Poll. 78: 189-198

Salomons, W. , Stigliani W.M. (1995). (Eds.), Biogeodynamics of Pollutants in Soils and Sediments. Springer, Berlin.

Schwertmann U. (1985). The effect of pedogenic environments on iron oxide minerals. *Adv. Soil Sci.* 1: 172-200.

Schwertmann U. and Taylor R. M. (1989). Iron oxides. In *Minerals soil environments*. 2nd Edition (J. B. Dixon and S. B. Weed, eds.) SSSA Book Series, no 1 Soil Science Society of America, Madison, WI, pp. 379-438.

Sharples, J.M., Meharg, A.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G. (2000a). Mechanism of arsenate resistance in the ericoid mycorrhizal fungus *Hymenoscyphus ercae*. *Plant Physiol.* 124, p.1327-1334

Sharples, J.M., Meharg, A.A., Chambers, S.M., Cairney, J.W.G. (2000b). Simbiotic solution to arsenic contamination. *Nature* 404, p.951-952

Smith, K.G., Reed, D.J. (1997). In: *Mycorrhizal Symbiosis*, second ed. Academic Press, London, p.586

Smith E, Naidu R, Alston AM (1998) Arsenic in the soil environment: a review. *Adv Agron* 64: 149–195.

Smith, S.E., Smith, A.F., Jakobsen, I., (2003). Mycorrhizal fungi can dominate phosphate supply to plants irrespective of growth responses. *Plant Physiol.* 133, 16–20.

Soderquist, C.J. , Crosby, D.G. , Bowers, J.B. (1974) *Anal. Chem.* 46, 155.

Sparks D. L. (1995). *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press, San Diego.

Styblo, M., Hughes, M., Thomas, D. , (1996). *J. Chromatogr. B*, 677, 161.

Sumner M. E. (eds.). (2000). *Environmental Soil Chemistry*. Academic Press, San Diego.

Sun X. and Doner H.E. (1996). An investigation of arsenate and arsenito bonding structures on goethite by FTIR. *Soil Sci.* 161 : 865-872.

Tao, Y., Zhang, S., Yuan, W. J., & Shan, X. Q. (2006). Effect of oxalate and phosphate on the release of arsenic from contaminated soils and arsenic accumulation in wheat. *Chemosphere*, 65, 1281–1287. doi:10.1016/j.

Thomas, P., Fannies, J.K., Williams, J.G. (1997). *J. Anal. At. Spectrom.* 12, 1367.

Thomas, D.J., Styblo, M. , Lin, S., (2001). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 176, 127.

Tsunetoshi, Y., (2000). *Biomed. Res. Trace Elem.* 11, 54.

Ullrich-Eberius CI, Sanz A, Novacky A.J., (1989). Evaluation of arsenate- and vanadate-

associated changes of electrical membrane potential and phosphate transport in *Lemna gibba*-G1. *J Exp Bot* 40: 119–128.

Ultra, V. U., Tanaka, Jr. S., Sakurai, K., Iwasaki, K., (2007). Effects of arbuscular mycorrhiza and phosphorus application on arsenic toxicity in sunflower (*Helianthus annuus* L.) and on the transformation of arsenic in the rhizosphere. *Plant Soil* 290:29–41.

U.S. EPA, (2004). Monitoring arsenic in the Environment: A Review of Science and technologies for Field Measurements and Sensors.

U.S. Environmental Protection Agency, (1997). Office of Solid Waste and Emergency Response. Recent Development for In-Situ Treatment of Metal Contaminated Soils; U.S. Government Printing Office: Washington, DC; EPA-542-R-97-004.

Vela, N. P., Heitkemper, D. T., Stewart, K. R., (2001). *Analyst*, 126, 1011.

Vidal, M., Lopez-Sanchez, J., F. Sastre, J., Jimenez, G., Dagnac, T., Rubio, R., Rauret, G., (1999). *Sci. Total Environ.* 242, 131.

Vilanò, M., Rubio, R., (2000) . *Appl. Organomet. Chem.* 15, 658.

Violante A., Colombo C. and Buondonno, A. (1991). Competitive adsorption of phosphate and oxalate by aluminum oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 55: 65-70.

Violante A. and Gianfreda L. (2000). Role of biomolecules in the formation of variable-charge minerals and organo-mineral complexes and their reactivity with plant nutrients and organics in soil. In: *Soil Biochemistry Vol. 10.* (J-M. Bollag and G. Stotzky, Eds).

Violante A. and Huang P. M. (1989). Influence of oxidation treatments on surface properties and reactivities of short range ordered products of aluminum. *Soil Science Society of America Journal*, 53, 1402-1407.

Violante, A., Pigna, M. (2002). Competitive sorption of arseniate and phosphate on different clay minerals and soil. *Soil Sci. Soc. Am.J.* 66, p.1788-1796.

Violante, A., Ricciardella, Del Gaudio, S., Pigna, M. (2006). Coprecipitation of Arsenate with Metal oxides: Nature, Mineralogy and Reactivity of Aluminium Precipitates. *Environ. Sci. e Technol.* 40, p. 4961-4967

Violante, A., Del Gaudio, S., Pigna, M., Pucci, M., Amalfitano, C. (2007a). Sorption and desorption of arsenic by soil minerals and soils in the presence of nutrients and root exudates. In: *Interactions of Soil Minerals, Organic Matter and Microorganism in Soil.* Huang, P.M., Violante, A. (Eds). Springer-Verlag New York.

Walsh, L. M. & Keeney, D. R., (1975). Behaviour and phytotoxicity of inorganic arsenicals in soils. In *Arsenical pesticides*, ed. by E. A. Woolson, 35-52, Washington DC,

American Chemical Society.

Walsh, L.M., Sumner ,M.E. Keeney, D.R. , (1997). Occurrence and distribution of arsenic in soil and plant. *Environ. Health Perspect.* 19, 67-71

Wefer K. and Misra C. (1987). Oxides and hydroxides of aluminum. Alcoa Technical, Paper 19, 92 pp.

Wenzel, W. W., Wieshammer, G., Fitz , W. J., and Puschenreiter, M., (2001). Novel rhizobox design to assess rhizosphere characteristics at high spatial Resolution *Plant and Soil* 237: 37–45.

Wettewrhahn-Jennette K. (1981) The role of metals in arcinogenesis. *Biochemistry and metabolism environ. Health Perspect*, 40, 233-252.

Woolson E.A., Axely J.H. and Kearney P.C. (1973). The chemistry and phytotoxicity of arsenic in soils: Effect of time and phosphorus. *Soil Sci. Am. Proc.* 37:254-259.

Xu, Y. Chen, X. Hu, Z. (1994). *Anal. Chim. Acta* 292, 191.

Xu, X. Y., McGrath, S. P., and Zhao, F. J., (2007). Rapid reduction of arsenate in the medium mediated by plant roots

Xu,X .Y ., Mcgrath,S.P ., Meharg,A.A., and Zhao, F.J., (2008). Growing Rice aerobically markedly decreases arsenic accumulation.

Yu, Y., Zhang, S., Huang, H., Luo, L., Wien, B., (2009). Arsenic accumulation and speciation in maize as affected by inoculation with arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *J. Agric. Food Chem.* 57, 3695-3701.

Zhang, H., Davison, W., (1995). Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurement of trace metals in aqueous solution. *Anal. Chem.* 67, 3391-3400.

Zhang, H., Davison, W., Gadi, R., Kobayashi, T., (1998). *Anal. Chim. Acta*, 370, 29-38.

Ringraziamenti

La mia esperienza formativa giunge al termine ed il mio pensiero vive nel ricordo di tutte le persone che ho incontrato durante questo periodo.

Un sentito ringraziamento va a coloro che hanno supportato la mia attività di ricerca e che hanno reso possibile la stesura di questo elaborato in particolare ringrazio il professore Antonio Violante e il dott. Massimo Pigna che mi hanno spronato e supportato durante questi anni, assecondando ogni mia follia, alla dott.ssa Enza Cozzolino per la dedizione, la professionalità e la passione che ha saputo trasmettermi per la ricerca.

Voglio inoltre rendere grazie al coordinatore del dottorato di ricerca il professore Matteo Lorito e collaboratrici Claudia Capodilupo e Giuliana Lorito per l'impeccabile organizzazione del corso e per la infinita pazienza avuta nei miei riguardi.

Resterà nei miei ricordi il gruppo di ricerca del professore Gian Pietro Molinari dell'Università Cattolica del Sacro Cuore, in particolare il dott. Gian Maria Beone guida del sapere durante l'attività di ricerca condotta a Piacenza, il dott. Paolo Lodigiani che mi ha istruito sulle corrette pratiche del loro laboratorio di analisi, la dott.ssa Ilenia Cattani, la dott.ssa Anna Flora Campanale e il tecnico di laboratorio Luisa.

Un grande ringraziamento ai miei cari amici del parco cerimele con i quali ho condiviso e condivido tutt'oggi momenti bellissimi in particolare Fabio, Chris, Corrado, Tonino e il nostro caro amico Francesco (Ciccio), onnipresente soprattutto nei momenti di gioia.

La mia famiglia sostegno e mio punto di riferimento, il mio caro padre che resta sempre nel mio cuore, mia madre, i miei fratelli Flora e Guglielmo e mio caro cognato Italo.

Non sarei riuscito a raggiungere questo prestigioso traguardo se non avessi avuto al mio fianco la mia ragazza, Annarita, ancora di salvezza nei momenti difficili e mio spirito guida. Ringrazio la madre Titina per averla generata e le tre sorelle con i rispettivi mariti, fidanzati e figli Imma, Cira, Valentina, Marco M., Marco C., Alessandro, Daniela (sciugarina) e Fausto (ninnolo).

30 novembre 2010

Roberto Maria De Santis